

Funktionsanalysen nicht-kodierender genomischer DNA-Bereiche unter Berücksichtigung biomathematischer Modelle

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Sandra Götze
aus Erwitte

| | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| 1. Referent: | Prof. Dr. J. Bode |
| 2. Referent: | Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel |
| eingereicht am: | 20.02.2003 |
| mündliche Prüfung (Disputation) am: | 05.05.2003 |

| | |
|------------|------|
| Druckjahr: | 2003 |
|------------|------|

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

GOETZE S., GLUCH A., BENHAM C., BODE J. (2003) Computational and in vitro analysis of destabilized DNA regions in the interferon gene cluster: potential of predicting functional gene domains; *Biochemistry* 42(1): 154-66

GOETZE S., HUESEMANN Y., BAER A., BODE J. (2003) Functional Characterization of Transgene Integration Patterns by Halo-FISH: Electroporation versus Retroviral Infection; *Biochemistry* 42(23): 7035-43

BODE J., GOETZE S., ERNST E., HÜSEMANN Y., BAER A., SEIBLER J., MIELKE C. (2003) New Comprehensive Biochemistry-Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells: Architecture and utilization of highly-expressed genomic sites; *Elsevier, Amsterdam, in press*

BODE J., GOETZE S., HENG H., KRAWETZ S. A., BENHAM C. (2003) From DNA structure to gene expression: Mediators of nuclear compartmentalization and -dynamics; *Chrom Res, in press*

HENG H. H. Q., GOETZE S., YE C. J., LU W., LIU G., BREMER S., HUGHES M., BODE J., KRAWETZ S. A., Chromatin Loops are selectively anchored using Scaffold/Matrix attachment regions; *zur Veröffentlichung eingereicht*

BODE J., GOETZE S., GLUCH A., TSUTSUI K., BENHAM C., Correlations between Scaffold/Matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy; *zur Veröffentlichung eingereicht*

Tagungsbeiträge

BODE J., BAER A., ERNST E., GOETZE S., KNOPP A., NEHLSSEN K., BENHAM C. (2001) Definition of autonomously regulated chromatin domains and utilization of their active elements; *ESF-Workshop 2001*

GOETZE S., KNOPP-GLUCH A., BENHAM C., KRAWETZ S. A., BODE J. (2001) Biomathematical and in vitro analysis of destabilized regions in the interferon gene cluster; *German Conference on Bioinformatics 2001*

KNOPP-GLUCH A., GOETZE S., BENHAM C., FRISCH M., KRAWETZ S. A., BODE J. (2001) Analysis of biomathematically predicted Scaffold / Matrix Attached Regions (S/MARs) by three different approaches; *German Conference on Bioinformatics 2001*

GOETZE S., HENG H. H. Q., KRAWETZ S. A., BODE J. (2002) Halo-FISH: Elucidating the nucleus; *CSH: Dynamic Organization of Nuclear Function*

BODE J., GOETZE S., HUESEMAN Y., NEHLSSEN K (2002) Nuclear Function and Vector Design; 2nd *Elmau Conference on Nuclear Organisation*

GOETZE S., GLUCH A., BENHAM C., BODE J. (2002) Computational and in vitro analysis of destabilized DNA regions in the interferon gene cluster: potential of predicting functional gene domains; *The Genetic and Molecular Basis of human Disease 2002*

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung | IV |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Aufgabenstellung | 1 |
| 2. Grundlagen | 3 |
| 2.1 Der Zellkern | 3 |
| 2.1.1 Die Architektur des Zellkerns | 3 |
| 2.1.2 Nukleäre Lamine und deren Aufgabe in der Zellkernarchitektur | 4 |
| 2.2 Die Organisation des Chromatins | 5 |
| 2.3 Die nukleäre Matrix und <i>scaffold/matrix attachment regions</i> (S/MARs) | 7 |
| 2.3.1 Die Zusammensetzung der Kernmatrix | 7 |
| 2.3.2 Struktur und Funktion von S/MAR Elementen | 8 |
| 2.3.3 Der S/MAR-Bindungsassay | 9 |
| 2.3.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung - FISH | 11 |
| 2.3.5 Computergestützte Vorhersagen von S/MAR-Elementen | 11 |
| 2.3.5.1 Das SIDD-Profil | 11 |
| 2.3.5.2 Der MAR-Finder | 12 |
| 2.3.5.3 Der Genomatix S/MARTest | 12 |
| 2.4 Interferone | 13 |
| 2.4.1 Interferone und ihre biologische Funktion | 13 |
| 2.4.2 Der humane Typ I Interferon-Gencluster | 13 |
| 2.5 Chromatindomänen und Transgenintegration | 14 |
| 3. Ergebnisse | 15 |
| 3.1 S/MAR-Elemente im humanen Typ I Interferon-Gencluster | 15 |
| 3.2 S/MAR-Elemente in intergenischen Bereichen des Typ I Interferon-Genclusters | 21 |
| 3.3 Prokaryontische destabilisierte DNA-Elemente | 25 |
| 3.4 Visualisierung von S/MAR-Kernmatrix Interaktionen <i>in situ</i> mittels Halo-FISH | 28 |
| 3.5 Transgen-Integration in <i>scaffold attachment regions</i> abhängig vom Gentransfer: Retrovirale Infektion versus Elektroporation | 36 |
| 3.5.1 Halo-FISH Analysen an stabil exprimierenden BHK-Transfektanten | 36 |
| 3.5.2 Halo-FISH Analysen an instabil exprimierenden BHK-Transfektanten | 42 |
| 4. Diskussion & Ausblick | 45 |
| 4.1 Potentielle Funktionen von S/MAR-Elementen im Bereich der DNA-Organisation und -Regulation | 45 |
| 4.1.1 Genassoziierte S/MAR-Elemente | 45 |
| 4.1.2 Intergenische S/MAR-Elemente | 47 |
| 4.1.3 Die unterschiedlichen Ebenen der DNA-Kernmatrix Interaktion | 50 |
| 4.1.4 Spezifikation von S/MAR-Elementen: ein Ausblick | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 Unterschiede zwischen eukaryontischen und prokaryontischen <i>unpairing elements</i> (UEs) | 55 |
| 4.3 In-situ Analyse der DNA-Kernmatrix Interaktion | 56 |
| 4.3.1 FISH-Analysen zum Nachweis von S/MAR-Bindungsverhalten <i>in situ</i> | 57 |
| 4.3.2 S/MAR-Elemente und Transgenintegration | 60 |
| 4.4 S/MAR-Elemente: ein Fazit | 62 |
| 5. Material & Methoden | 64 |
| 5.1 Geräte | 64 |
| 5.2 Materialien | 65 |
| 5.2.1 Plasmidvektoren | 65 |
| 5.2.2 Primer (angegeben in 5'-3'-Orientierung) | 67 |
| 5.2.3 Bakterienstämme (<i>E.coli</i>) | 68 |
| 5.2.4 Zelllinien | 68 |
| 5.3 Allgemeine Grundtechniken | 69 |
| 5.3.1 Sterilisieren | 69 |
| 5.3.2 Phenolisierung von Nukleinsäuren | 69 |
| 5.3.3 Fällung von Nukleinsäuren | 69 |
| 5.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 69 |
| 5.4 Arbeiten mit <i>E.coli</i> | 70 |
| 5.4.1 Kultivierung von Bakterien | 70 |
| 5.4.2 Herstellung kompetenter Bakterien | 70 |
| 5.4.3 Transformation von <i>E.coli</i> | 70 |
| 5.4.4 Anlage von Glycerinkulturen | 71 |
| 5.5 Isolierung von Nukleinsäuren | 71 |
| 5.5.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab: <i>Boiling Prep</i> | 71 |
| 5.5.2 Präparative Plasmidisolierung | 72 |
| 5.5.3 DNA-Rückgewinnung aus Gelen mittels „QIAquick“ Gel Extraktions Kit | 73 |
| 5.5.4 Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen: Quick-HMW-DNA | 73 |
| 5.5.5 Isolierung von Kompetitor-DNA aus <i>E.coli</i> | 73 |
| 5.5.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen | 74 |
| 5.6 DNA-Modifizierung | 74 |
| 5.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen | 74 |
| 5.6.2 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden | 74 |
| 5.6.3 Dephosphorylierung | 75 |
| 5.6.4 T4-Kinase Reaktion | 75 |
| 5.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten | 75 |
| 5.6.6 DNA-Oligomerisierung | 76 |
| 5.6.7 Klonierungen mit dem Zero Blunt® PCR Cloning Kit | 76 |
| 5.7 Polymerase Chain Reaction (PCR) | 76 |
| 5.7.1 DNA-Amplifikation durch PCR | 76 |
| 5.7.2 <i>Light-Cycler Real Time</i> RT-PCR | 77 |
| 5.7.3 Sequenzierung von DNA | 78 |
| 5.8 Gelelektrophoresen | 78 |

| | |
|--|-----------|
| 5.8.1 Agarose Gelelektrophorese | 78 |
| 5.8.2 Sequenziergele | 79 |
| 5.9 Radioaktive Nachweismethoden | 79 |
| 5.9.1 DNA-Markierung mit dem <i>Rediprime DNA Labelling System</i> | 79 |
| 5.9.2 Klenow-Markierung von 5'-überhängenden DNA-Enden | 80 |
| 5.9.3 <i>Southern Blotting</i> | 80 |
| 5.10 Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen | 81 |
| 5.10.1 Medien und Lösungen | 81 |
| 5.10.2 Kultivierung von Zelllinien | 81 |
| 5.10.3 Passagieren | 81 |
| 5.10.4 Langzeitlagerung von Zellen | 82 |
| 5.10.5 Transfektion von Säugerzellen | 82 |
| 5.10.5.1 Transfektion von Säugerzellen mittels Calciumphosphat-DNA-Coprazipitation | 82 |
| 5.10.5.2 Transfektion von Säugerzellen mittels Elektroporation | 82 |
| 5.10.6 Durchführung einer Selektion | 83 |
| 5.10.7 Der Interferon-Test | 83 |
| 5.10.8 <i>Metaphasespreads</i> | 84 |
| 5.11 Proteinanalytik | 84 |
| 5.11.1 Nachweis für β -Galaktosidase | 84 |
| 5.11.1.1 Färbung von Zellen | 84 |
| 5.11.1.2 β -Galaktosidase aus Zellextrakten | 84 |
| 5.11.2 Nachweis von Luciferase | 85 |
| 5.12 Methoden zur Kernmatrixpräparation (<i>scaffold preparation</i>) | 85 |
| 5.12.1 Die Lithium-3,5-diiodosalicylat(LIS)-Extraktionsmethode | 85 |
| 5.12.2 Die modifizierte Hochsalzextraktionsmethode | 87 |
| 5.12.3 Reassoziationsexperimente | 87 |
| 5.12.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente | 88 |
| 5.13 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) | 88 |
| 5.13.1 Herstellung der DNA-Sonden mittels Nick-Translation | 88 |
| 5.13.2 <i>In situ</i> Hybridisierung | 89 |
| 5.13.3 Detektionssysteme für <i>in situ</i> Hybridisierungen | 89 |
| 5.13.3.1 Direkt markierte Sonden | 89 |
| 5.13.3.2 Indirekte Digoxigenin-11-UTP Markierung | 89 |
| 5.13.4 Mikroskopische Auswertung der <i>in situ</i> Hybridisierungen | 90 |
| 6. Abkürzungen und Zeichen | 91 |
| 7. Literatur | 94 |

Zusammenfassung

Über *stress-induced duplex destabilization* (SIDD)-Analysen konnten potentielle S/MAR-Elemente im Bereich von Genen, aber auch in ausgedehnten Gen-freien DNA-Regionen vorhergesagt werden. In dieser Arbeit sollten die SIDD-Vorhersagen über S/MAR-Bindungsstudien verifiziert werden. Mittels *in vitro* S/MAR-Bindungsversuchen konnte gezeigt werden, dass alle vorhergesagten, eukaryontischen destabilisierten Sequenzen ein Kernmatrix-Bindungspotential besitzen. Dabei wurde für Gene eine Art „struktureller Code“ festgestellt, der sich aus einem destabilisierten Promotor- und Terminatorbereich und einer stabilen kodierenden DNA-Region zusammensetzt. Diese Strukturierung ist universell für funktionelle Gene und konnte für Pseudogene nicht gefunden werden. Weiterhin wurden 250-300 bp große S/MAR-Elemente mit sehr starken Bindungsaktivitäten in einer Gen-freien Region des Interferon-Genclusters identifiziert. Über Wettbewerbsversuche konnte gezeigt werden, dass diese intergenischen S/MAR-Elemente im Vergleich zum humanen SAR-E Element und den genassoziierten S/MAR-Fragmenten einen anderen Bindungspartner an der Kernmatrix haben. Zur weiteren Funktionsanalyse der intergenischen S/MAR-Elemente wurden Luciferase-Reporterkonstrukte stabil in NIH-Zellen exprimiert. Dabei stellte sich heraus, dass die intergenischen S/MARs einen transkriptionsfördernden Effekt ausüben können, der ähnlich dem des SAR-E Elements ist. Zusätzlich zu den eukaryontischen S/MAR-Elementen wurden artifiziell erzeugte, prokaryontische destabilisierte DNA-Bereiche auf eine Kernmatrix-Bindungsaktivität hin untersucht. Diese ausgedehnten destabilisierten DNA-Bereiche wurden über die Oligomerisierung von *unpairing elements* (UEs) des prokaryontischen Ampicillin-Promotors bzw. -Terminators hergestellt. Bei den durchgeführten *in vitro* S/MAR-Bindungsversuchen zeigte sich, dass nur die oligomerisierten Promotorfragmente eine Affinität zur Kernmatrix besitzen, die Terminator-Oligomere binden dagegen nicht. Zur genaueren Analyse dieses Phänomens wurde die destabilisierte Ampicillin-Terminator Sequenz durch gezielte Punktmutationen minimal verändert und so den eukaryontischen S/MAR-Elementen angeglichen. Anschließende Bindungsstudien zeigten, dass durch diese Veränderungen eine Affinität der Terminator-Oligomere zur Kernmatrix erreicht werden kann.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden S/MAR-Bindungseigenschaften *in situ* über Halo-FISH Analysen untersucht. Maus LTK-Zellklone mit einer unterschiedlichen Kopienzahl des humanen IFNB1-Gens inklusive flankierendem SAR-E Element zeigten dabei voneinander abweichende Assoziationsmuster. Während ein bis zwei integrierte Transgen-Kopien pro Zellklon zu ca. 90% an der Kernmatrix zu finden sind, nimmt die prozentuale Kernmatrix-Assoziation der Transgene mit steigender Kopienzahl ab. Auch unter Transkriptionsbedingungen ändert sich dieser Assoziationsstatus nicht. Eine dynamische Nutzung von S/MAR-Sequenzen als DNA-Anker konnte bei der Hybridisierung der endogenen Interferon-Domäne in humanen MG63-Zellen festgestellt werden. Weiterhin wurde über FISH-Analysen die Integrationsspezifität eines retroviralen Expressionsplasmids entweder nach retroviraler Infektion oder nach Elektroporation der DNA untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Gentransferweg entscheidend für den Integrationsort des Transgens ist. Während die provirale DNA nach einer retroviralen Infektion in der Nähe von S/MAR-Elementen zu finden ist, ist das bei elektroporierten Zellklonen nicht der Fall. Die Expressionshöhe der integrierten Transgene spiegelt sich nur minimal im Kernmatrix-Assoziationsverhalten wider. Auch genetisch instabile Klone, deren Genexpression durch *silencing* Mechanismen abgeschaltet wurde, zeigen *in situ* keine veränderte Kernmatrix-Bindungsaktivität.

1. Einleitung

Die rasante Entwicklung der Molekularbiologie in den letzten Jahren hat zu einer immer größeren Menge an Sequenzdaten geführt. Um diese Sequenzdaten sinnvoll einzuordnen, kommt einem Verständnis von Genregulation und Genomorganisation eine immer größere Rolle zu. Obwohl das Säuger-Genom genug DNA enthält (3×10^9 bp), um prinzipiell 3 Millionen Proteine von durchschnittlicher Größe zu kodieren, besitzt das menschliche Genom nach den vorläufigen Analysen des Humangenomprojektes nur etwa 30000-35000 Gene (*International Human Genome Sequencing Consortium* 2001). Das entspricht nur ca. 1-2% des menschlichen Genoms, bei *Drosophila* als einfacher strukturiertem Organismus beträgt dieser Wert immerhin ungefähr 10%. Was immer die restliche „nicht-essentielle“ DNA vor allem bei höheren Eukaryonten-Chromosomen für eine Funktion haben mag, ein großes Hindernis scheint diese Extra-DNA nicht zu sein. Vielmehr werden essentielle kodierende Regionen häufig durch lange Abschnitte nicht-kodierender DNA unterbrochen. Einer Untersuchung dieser intergenischen Sequenzen wird für die Zukunft immer wichtiger werden, eine systematische Analyse der S/MAR-Elemente (*scaffold / matrix attachment regions*) im Interferon-Gencluster ist ein erster Schritt in diese Richtung.

S/MARs spielen als Strukturelemente eine wichtige Rolle bei der Organisation des Zellkerns. Sie konnten bisher unter anderem für eine Reihe von Genen an deren Domänengrenzen nachgewiesen werden. Dort übernehmen sie wichtige Aufgaben bei der Regulation der DNA-Transkription und -Replikation und stimulieren in stabilen Transfektionen die Transkriptionsinitiationsraten der integrierten Gene. Die Funktionsweise der S/MAR-Elemente im Hinblick auf diese regulatorischen Prozesse ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Auch die Vorhersage von S/MARs mittels Sequenzvergleichen ist lange auf erhebliche Schwierigkeiten gestoßen, da S/MAR-Elemente keinen Konsensus hinsichtlich ihrer Primärstruktur erkennen lassen. Für die zukünftige Funktionsanalyse der Genomorganisation ist eine gezielte Mappierung und Charakterisierung von S/MAR-Elementen jedoch von entscheidender Bedeutung. Nur so wird sich die Funktionsanalyse kodierender Bereiche und flankierender DNA-Elemente, wie zum Beispiel Promotoren oder Polyadenylierungsstellen, verbessern lassen. Vor allem in Hinblick auf eine gentherapeutische Anwendung ist dieses grundlegende Verständnis der Funktion von Gendomänen essentiell. Ein Gen ist mehr als die Summe seiner Introns, nur eine stabile Struktur garantiert eine stabile Expression.

1.1 Aufgabenstellung

Ziel dieser Promotionsarbeit war, S/MAR-Elemente *in vitro* und *in situ* umfassend zu analysieren und zu charakterisieren. Im Zuge des Humangenomprojekts zielten bisherige wissenschaftliche Arbeiten häufig auf die Analyse von kodierenden DNA-Regionen. Diese Arbeit dagegen ist eine der ersten, die sich auf die Analyse der intergenischen Bereiche fokussiert.

S/MAR-Elemente sollten vor allem im Bereich des Interferon-Genclusters identifiziert und ihre Kernmatrix-Bindungsaffinitäten miteinander verglichen werden. Die generierten Daten sollten unter anderem zur Bestätigung, Verbesserung und Weiterentwicklung der SIDD-Vorhersageprofile dienen. Die bisher in der S/MAR-Datenbank S/MARt DB aufgelisteten S/MAR-Elemente wurden der Literatur entnommen, ihre Kernmatrix-Bindungsaktivitäten sind

jedoch aufgrund unterschiedlicher Identifikationswege nicht miteinander vergleichbar und deshalb für die Erstellung biomathematischer Vorhersagemodelle schlecht geeignet.

Zusätzlich zu den eukaryontischen S/MAR-Elementen sollten in dieser Arbeit auch prokaryontische, destabilisierte DNA-Bereiche auf eine Affinität zur nukleären Matrix hin untersucht werden. Da Prokaryonten selbst keine S/MARs besitzen, sollten über die Oligomerisierung von *unpairing elements* im Bereich des Ampicillin-Promotors und -Terminators artifizielle S/MAR-Elemente generiert werden. Gelingt es, artifizielle S/MARs herzustellen, erreichte man einerseits ein besseres Verständnis der Organisation von S/MAR-Elementen. Weiterhin böten sich interessante Anwendungsmöglichkeiten auf dem Gebiet des Vektordesigns.

Ein neues Verfahren, um DNA-Kernmatrix Interaktionen *in situ* beobachten zu können, ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die FISH-Methode sollte im Rahmen dieser Arbeit im Labor etabliert und anschließend für gezielte Experimente eingesetzt werden. So kann zum Beispiel der Assoziationsstatus von Genen an der Kernmatrix Aufschluss über die transkriptionelle Aktivität oder das Abschalten der Transgenexpression geben. Deswegen sollte unter anderem der transkriptionell aktive Zustand von Klonen untersucht werden, die eine unterschiedliche Kopienzahl des humanen IFNB1-Gens mit flankierendem SAR-E Element enthalten.

Weiterhin sollte die Methode der *in situ* Hybridisierung angewandt werden, um den Assoziationsstatus von Klonen zu untersuchen, die über unterschiedliche Gentransfermethoden generiert wurden. Verglichen werden sollten Klone, die entweder über retrovirale Infektion oder über Elektroporation gewonnen wurden. Damit sollten zum einen Expressions-, zum anderen Stabilitätsunterschiede in bezug auf die Transgenintegration untersucht werden.

2. Grundlagen

2.1 Der Zellkern

2.1.1 Die Architektur des Zellkerns

In Eukaryonten ist die DNA zum Großteil im Zellkern lokalisiert und verteilt sich dort auf verschieden große Chromosomen. Die Anzahl an Chromosomen variiert erheblich, so besitzen Hefen zwischen 12 und 18 Chromosomen, wohingegen menschliche Zellen einen diploiden Chromosomensatz von je 23 Chromosomen besitzen. Die Trennung des Erbmateri als in Eukaryonten vom Rest der Zelle dient - wie auch bei anderen Organellen - dem räumlichen Zusammenfassen verwandter biochemischer Reaktionen in autonomen Reaktionsräumen oder „Kompartimenten“. Der Inhalt des Zellkerns wird von zwei Phospholipid-Membranen umschlossen und so vom Rest der Zelle abgegrenzt. Die innere Kernmembran begrenzt den eigentlichen Kern, bei vielen Zellen geht die äußere Kernmembran kontinuierlich in das weit in das Zytoplasma reichende Membransystem des endoplasmatischen Reticulums über. Die Kernporen, die aus bestimmten Membranproteinen bestehen, fungieren als Kanäle und regeln den Stoffaustausch zwischen Kern und Zytoplasma.

Die größten Subkompartimente im Zellkern werden durch Bereiche gebildet, die jeweils nur von der DNA eines bestimmten Chromosoms ausgefüllt werden. Da diese Bereiche nicht miteinander überlappen, werden sie als Chromosomen-Territorien (CT) bezeichnet (Lichter et al. 1988). Die Größe eines CT's ist von der Menge der darin befindlichen DNA abhängig, so ist z.B. das Territorium des humanen Chromosoms 1 wesentlich größer als das von Chromosom 18. Offenbar wird der Ort eines CT's von dessen transkriptioneller Aktivität beeinflusst. Vergleicht man die humanen Chromosomen 18 und 19, die ähnlich groß sind und vergleichbare Territorien einnehmen, aber eine unterschiedliche Anzahl an aktiven Genen besitzen, so befindet sich das inaktivere Chromosom 18 bevorzugt in der Nähe des Kernrandes, wohingegen das aktivere Chromosom 19 im Inneren des Zellkerns lokalisiert ist (Croft et al. 1999). Versuche deuten daraufhin, dass inaktive Gene zumeist im kompakten Inneren eines Territoriums, aktive Gene dagegen bevorzugt an der Oberfläche der Territorien lokalisiert sind (Dietzel et al. 1999).

Die einzelnen Chromosomen-Territorien sind durch einen DNA-freien Raum voneinander getrennt. Dieser Raum wird als Inter-Chromatin-Domänen-Kompartiment (ICD-Kompartiment) bezeichnet. Markiert man das gesamte Chromatin über ein mit GFP fusioniertes Histon H2B Protein, erkennt man die fluoreszierenden Chromatin-Kompartimente und das nicht markierte ICD-Kompartiment (Cremer und Cremer 2001). Ursprünglich wurde angenommen, dass das ICD-Kompartiment sich von den Kernporen beginnend zwischen den Chromosomen ausdehnt. Neuere Annahmen gehen davon aus, dass Verzweigungen bis in das innere der Chromosomen-Territorien möglich sind (Cremer et al. 2000). Während kleinere nukleäre Proteine frei im Zellkern diffundieren können, wie vielfach über *Fluorescence-Recovery-after-Photobleaching* (FRAP) Experimente gezeigt, könnte der IC-Raum wichtig für die Diffusion größerer Proteinkomplexe und für den Transport von Makromolekülen wie der mRNA sein (Misteli et al. 2001).

Ein anderes Kompartiment im Zellkern bildet der Nukleolus. Der Nukleolus ist als Suborganelle des Zellkerns ohne weiteres mit dem Lichtmikroskop erkennbar. In ihm entsteht der größte Teil der ribosomalen RNA. Der außerhalb des Nukleolus im Zellkern vorhandene Raum wird generell auch als Nukleoplasma bezeichnet. Die meisten eukaryontischen Zellen

enthalten 1-5 Nukleoli mit einem Durchmesser von 0,5-5,0 μm .

Weitere funktionelle Subkompartimente im Zellkern sind z.B. fleckenförmige *Speckles*, die als Speicherort für Splice-Proteine dienen, *PML-bodies*, denen man eine Rolle in der transkriptionellen Regulation zuordnet, und andere (Spector et al. 2001). In vielen Fällen ist die Funktion der einzelnen Subkompartimente noch weitgehend unklar, allgemein zeichnet sich jedoch eine Assoziation der verschiedenen *nuclear bodies* mit spezifischen Genorten ab (vgl. Nukleolus und rRNA-Gene).

2.1.2 Nukleäre Lamine und deren Aufgabe in der Zellkernarchitektur

Die innere Kernmembran wird gestützt von einem gitterähnlichen Proteingerüst, der sogenannten Kernlamina, die je nach Organismus aus ein bis fünf Proteinen zusammengesetzt ist (Abb 2.1). Diese Proteine werden als Lamine bezeichnet. Säugetiere besitzen drei Lamingene, die für sieben Lamin-Spliceisoformen kodieren. Typ-A Lamine (vier Isoformen)

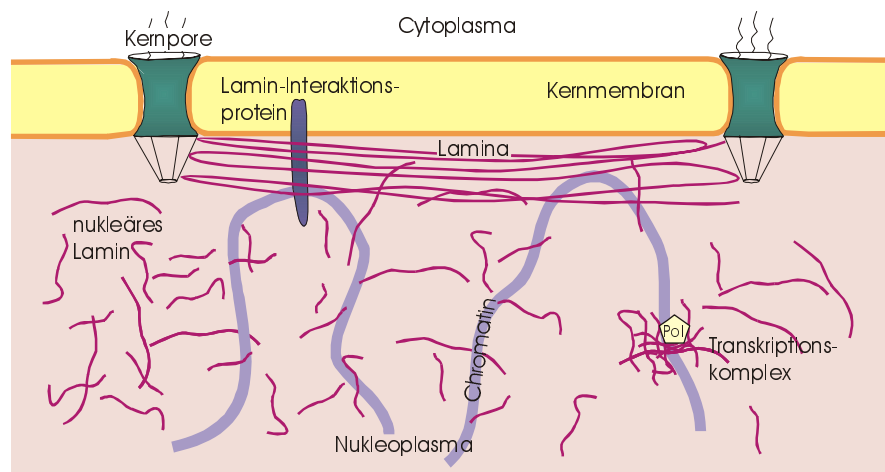


Abb. 2.1 Die Lamina und nukleäre Lamine

Die Abbildung zeigt die Ausdehnung der Lamina zwischen zwei Kernporen. Zwei Interphase-Chromatindomänen sind skizziert, wobei an eine Domäne ein DNA-Transkriptionszentrum assoziiert ist. Dieses Transkriptionszentrum enthält höhere Konzentrationen an nukleärem Lamin (nach Goldman et al. 2002).

Pol: Polymerase

leiten sich vom LMNA-Gen ab, Typ-B Lamine werden von LMNB1 und LMNB2 kodiert (Goldman et al. 2002). Jede Vertebraten-Zelle exprimiert zumindest ein Typ-B Lamin, wohingegen die Transkription von Lamin A Isoformen entwicklungs- und differenzierungsspezifisch an- bzw. abgeschaltet wird.

Zusätzlich zu der peripheren Kernlamina bilden Lamine auch nukleoplasmatische Strukturen (Abb. 2.1). Diese Strukturen

können punkt- oder netzförmig sein, was durch Immuno-Fluoreszenzanalysen und Lebendzellaufnahmen mit GFP-markierten Laminen (Moir et al. 2000) gezeigt wurde. Die nukleären Lamine sind wie ihre cytoplasmatischen Gegenstücke, die Intermediärfilamente, schwer zu extrahieren unter Bedingungen, die einen Großteil aller anderen Proteine solubilisieren (2M NaCl, Detergenzien). Elektronenmikroskopische Aufnahmen solch extrahierter Strukturen prägten den Begriff der nukleären Matrix (Berezney und Coffey 1974, Nickerson 2001).

Seit ihrer Entdeckung ist die nukleäre Matrix als Komplex aus verschiedenen Proteinen und RNA beschrieben worden (Berezney und Coffey 1974). Zu diesem Komplex zählen außer Laminen vor allem hnRNP Proteine wie SAF-A, Topoisomerase II (Gasser et al. 1986, Mirkovitch et al. 1988), RNA-Polymerase II (Lewis et al. 1984) und heterogene nukleäre RNA (hnRNA) (Details siehe Abschnitt 2.3). Die Existenz einer permanenten Kernmatrix ist eine

lang diskutierte Kontroverse der Molekularbiologie. Vielfach wurde argumentiert, dass die Isolierung der nukleären Matrix biochemische Artefakte produziert (Hancock et al. 2000), aber die nukleoplasmatischen stabilen Kernlaminstrukturen sprechen deutlich für das Konzept der Kernmatrix. Dabei ist mit einer Matrix durchaus keine rigide Struktur gemeint, sondern mobile, möglicherweise teils vernetzte Elemente, die gut zum Bild eines ICD-Kompartiments passen. Der ICD-Raum und dessen Inhalt könnte demzufolge die *in situ* Kernmatrix repräsentieren.

Lamine interagieren mit einer Reihe von Proteinen wie den LAP-Proteinen (*Lamin Associated Proteins*), Emerin, BAF und anderen (Cohen et al. 2001). Viele dieser Proteine wiederum, ebenso wie die Lamine, können mit Chromatin interagieren und tragen so zur Strukturierung des Zellkerns bei (Taniura et al. 1995).

Interessanterweise zeigen die Genom-Sequenzen von Hefe und *Arabidopsis* keine Sequenzhomologie zu den Lamingenen der Vertebraten, was darauf hindeutet, dass sich die nukleären Lamine mit dem Übergang von einer „geschlossenen“ zu einer „offenen“ Mitose entwickelt haben. Trotzdem können Strukturen ähnlichen denen einer Kernmatrix sowohl in Hefen als auch in *Arabidopsis* beobachtet werden. In diesen Spezies haben sich also während der Evolution alternative Strukturproteine entwickelt (Cohen et al. 2001).

2.2 Die Organisation des Chromatins

„Ordnung ist das halbe Leben“

Die Kompartimentierung des Genoms durch die Kernhülle ist ein wesentlicher Unterschied zwischen eukaryontischen und prokaryontischen Zellen und bringt mit sich, dass der Zellkern das am dichtesten gepackte Organell einer eukaryontischen Zelle ist. Um trotz der enormen Dichte von DNA, RNA und Proteinen im Zellkern einen geordneten und regulierbaren Ablauf genetischer Prozesse zu ermöglichen, ist ein hohes Maß an Organisation erforderlich. Diese Organisation wird durch einen hierarchischen Aufbau des Zellkerns in mehreren Stufen gewährleistet. Dieser hierarchische Aufbau lässt sich vor allem durch die verschiedenen Verpackungsstufen der DNA verdeutlichen.

Die DNA einer haploiden menschlichen Zelle besteht aus 3×10^9 Basenpaaren und würde im extrahierten Zustand eine Länge von ungefähr einem Meter erreichen. Um diese Menge an DNA in einem Zellkern von einigen Mikrometern Durchmesser unterzubringen, ist eine komplizierte Strukturierung und Verpackung mithilfe verschiedener Proteine notwendig. Die erste Verpackungsstufe findet man auf der DNA-Ebene durch Assoziation mit verschiedenen basischen Histonen. Die genomische DNA, an die Histonproteine gebunden sind, bezeichnet man als Chromatin. Mikroskopisch lassen sich zwei unterschiedlich dichte Packungszustände des Chromatins unterscheiden, das Hetero- und das Euchromatin. Heute weiß man, dass diese Packungszustände mit einer bestimmten Aktivität der dort lokalisierten Gene korrelieren. Das Euchromatin liegt während der Interphase nur schwach verpackt vor und ist der Ort einer aktiven Genexpression. Das optisch dunkler erscheinende Heterochromatin liegt häufig am Rand des Zellkerns, ist stark kondensiert und transkriptionell inaktiv. Diese Strukturierung der DNA beeinflusst deren Zugänglichkeit und somit die Expression bestimmter DNA Bereiche.

Die erste Verpackungsstufe der DNA mit Histonen wird auch als Nukleosom bezeichnet (Abb. 2.2). In einem Nukleosom sind 146 bp der DNA-Doppelhelix in Form einer linksgängigen Superhelix in knapp zwei Windungen um ein Oktamer aus Histon H2A, H2B, H3 und H4

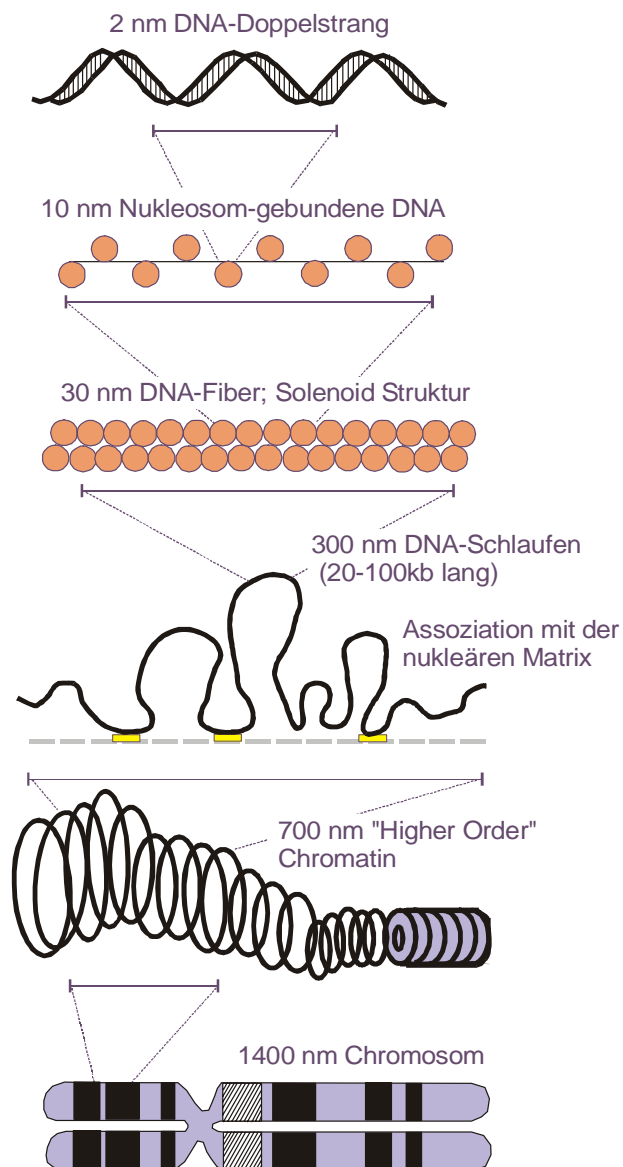


Abb. 2.2 Die verschiedenen Organisationsstufen des Chromatins

Nukleosomen bewirkt werden (Bode et al. 1986). Das Positionieren kann durch die geschilderten Histon-Modifikationen erreicht, aber auch von der DNA Sequenz direkt beeinflusst werden. AT-reiche Sequenzmotive ($AAAAN_6AAAA N_7AAAA$; T_mA_n), die in einer gebogenen DNA-Konformation resultieren, erleichtern eine enge Wicklung der DNA um die Histone.

Die zweite Verpackungsstufe der Chromatins wird durch die Bindung des fünften Histonproteins H1 an die zwischen den Nukleosomen liegende „linker“-DNA vermittelt. Wechselwirkungen zwischen den Histon H1 Molekülen führen zu einer 40fachen Komprimierung der DNA und zur Ausbildung der sogenannten 30 nm DNA-Fiber (Abb. 2.2). Die Anordnung dieser Fiber im Raum ist noch nicht vollständig geklärt, das populärste Modell ist zur Zeit das der Solenoid Struktur (Finch und Klug 1976). Dieses Modell geht von einer

gewunden (Richmond et al. 1984), was zu einer 6-7fachen Komprimierung der DNA führt. Außer strukturellen Funktionen haben Histone auch einen Einfluss auf die Transkriptionsregulation, die über Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung vermittelt werden (Wade et al. 1997, Davie 1998). Die Acetylierung eines Lysinrestes der aminoterminalen Domäne von Histonen zum Beispiel führt zu einer transkriptionellen Aktivierung der betroffenen DNA Domäne. Erklären lässt sich ein solcher Effekt durch die Kompensation positiver Ladungen, was eine Abschwächung der DNA-Histon-Bindung zur Folge hat und einen leichteren Zugang der Transkriptionsmaschinerie ermöglicht (Bode et al. 1986, Wolffe und Pruss 1996). Werden solche Effekte, die die Genexpression beeinflussen ohne die DNA-Sequenz zu verändern, vererbt, werden sie als epigenetische Effekte bezeichnet (Wolffe und Matzke 1999). Im Gegensatz zur Acetylierung führt die Methylierung zu einer Repression der DNA Expression. Über das Protein MeCP2 werden Deacetylasen und Korepressoren rekrutiert, was zu einer Verdichtung des Chromatins führt (Bestor TH 1998).

Die Nukleosomen sind statistisch über das Genom verteilt (etwa ein Nukleosom pro 200 Nukleotidpaare), wobei regulatorische Domänen von Genen meist frei von Histonen sind (Grunstein 1990). Solche freien DNA Bereiche können über ein sogenanntes Positionieren benachbarter

spiralförmigen Aufwicklung der Nukleosomen zu einem 30 nm Zylinder aus, eine Windung besteht dabei aus sechs Nukleosomen. Die starke elektrostatische Wechselwirkung der H1 Histone untereinander führen dabei zum Ausschluss von Transkriptionsfaktoren und zur Heterochromatisierung. Diese regelmäßige Nukleosomenstruktur wird durch kurze DNA Abschnitte unterbrochen, an denen die Nukleosomen durch sequenzspezifische DNA-bindende Proteine ersetzt wurden und so für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich sind.

Als eine 30 nm Faser wäre das typische menschliche Chromosom 0,1 m lang und könnte den Kern mehr als 100 mal durchmessen. Es muss also noch eine höhere Faltungsebene geben. Diese dritte Kondensationsstufe beinhaltet die schlaufenförmige Anheftung der DNA an die Kernmatrix. Die 5-200 kb großen voneinander unabhängigen DNA-Schleifen eines Interphase-kerns sind im Elektronenmikroskop nach der Beseitigung der Histone sichtbar. In Metaphase-Chromosomen sind diese Schleifen extrem dicht in radialer Anordnung gepackt (700 nm Chromatinstruktur). Die DNA-Bereiche, die die Bindung der DNA an die Kernmatrix vermitteln, werden *scaffold/matrix attachment regions* (S/MARs) genannt (Paulson und Laemmli 1977).

2.3 Die nukleäre Matrix und *scaffold/matrix attachment regions* (S/MARs)

2.3.1 Die Zusammensetzung der Kernmatrix

Das Konzept der Kernmatrix wurde bereits in Grundzügen in Zusammenhang mit den nukleären Laminen eingeführt. Die Kernmatrix, an der die Chromatinschleifen verankert sind, ist ein dem Cytoskelett analoges dynamisches Gerüst aus Proteinen und RNA. Dieses Netzwerk durchzieht das gesamte Innere des Zellkerns. Isoliert werden kann es durch die Extraktion löslicher Proteine und die enzymatische Entfernung des Chromatins. Abhängig von der verwendeten Extraktionsmethode wird das Netzwerk als Kernmatrix (*nuclear matrix*) (Berezney und Coffey 1974) oder Kerngerüst (*nuclear scaffold*) (Paulson und Laemmli 1977) bezeichnet.

Das Kerngerüst enthält die Lamina mit Teilen der Kernporenkomplexe, Überreste der Nukleoli sowie ein Netzwerk aus dem Inneren des Zellkerns. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von präparierten Kerngerüsten zeigen ein Netzwerk aus Fasern von 20-50 nm Durchmesser und daran angelagerte große Proteinkomplexe. Man nimmt an, dass diese Proteinkomplexe molekulare „Fabriken“ der DNA-Replikation oder -Transkription darstellen (Hozak et al. 1994, Moir et al. 2000). Die Proteinzusammensetzung der Kernmatrix ist teilweise vom Zell- oder Gewebetyp abhängig. Bei Zelltyp-spezifischen Bestandteilen der Kernmatrix handelt es sich insbesondere um Proteine wie Transkriptionsfaktoren, die eine regulierte Genexpression bewirken. Unabhängig davon findet man in allen untersuchten Zellen als Hauptbestandteil der Kernmatrix Proteine, die als hnRNP-Proteine bezeichnet werden und unter anderem für die Verpackung neu synthetisierter RNA verantwortlich sind. Weitere Bestandteile der Kernmatrix sind die Lamine A-C (Ludérus et al. 1992 und 1994), Topoisomerase II (Gasser et al. 1986, Mirkovitch et al. 1988), DNA Polymerase α/β (Foster und Collins 1985), RNA Polymerase II (Lewis et al. 1984), Histon-Deacetylasen und -Acetyltransferasen (Hendzel et al. 1994). Die Zusammensetzung des Kerngerüsts aus strukturgebenden und regulatorischen Proteinen legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Kernmatrix als Plattform für diverse Prozesse dient, die DNA, RNA und Proteine räumlich miteinander verbindet. Eine zunehmende Anzahl an identifizierten Kernmatrix-Proteinen scheinen regulatorische und strukturelle Funktionen miteinander zu vereinen. Solche Proteine sind unter anderem SAF-A/hnRNP-U, SAF-B (Romig

et al. 1992, Renz et al. 1996), SATB1 (Dickinson et al. 1992 und 1997), ARBP/MeCP2 (von Kries et al. 1991, Weitzel et al. 1997), HMG I/(Y) und NuMA (Zeng et al. 1994). So sind z.B. für SAF-B neben DNA-Bindungseigenschaften auch Funktionen bei Splice-Vorgängen nachgewiesen worden (Nayler et al. 1998). SAF-A besitzt neben der DNA-Bindungsdomäne eine RNA-bindende RGG-Box und ist an der Verpackung der hnRNA beteiligt (Fackelmayer et al. 1994). Trotz der immer größer werdenden Gruppe an Proteinen, die als Matrixproteine bezeichnet werden, ist es bis heute nicht gelungen, die eigentlich strukturbildenden Proteinkomponenten der Kernmatrix eindeutig zu identifizieren. Die nukleoplasmatischen Laminae stellen aber nach heutigem Erkenntnisstand eine interessante Kandidatengruppe als Strukturkomponenten dar. Denkbar wäre auch, dass in der lebenden Zelle keine rigiden Matrixstrukturen existieren, sondern dass die nach der Hochsalzextraktion erhaltenen Netzwerke Aggregate einiger ICD-Kompartiment Proteine sind.

2.3.2 Struktur und Funktion von S/MAR Elementen

S/MAR Elemente sind DNA-Bereiche, die als Anheftungsstellen des Chromatins an die Kernmatrix dienen. Historisch werden sie - je nach Methode der Isolierung - als SARs (*scaffold attachment regions*) (Gasser und Laemmli 1986) oder MARs (*matrix associated regions*) (Cockerill und Garrard 1986) bezeichnet. Da gezeigt werden konnte, dass sich diese durch unterschiedliche Methoden isolierten Fragmente nicht in ihrer biologischen Funktion unterscheiden, wurde der Begriff „S/MARs“ für Kernmatrix-bindende DNA-Bereiche geprägt.

S/MAR-Elemente liegen fast immer außerhalb proteinkodierender Bereiche. Häufig liegen sie an den Domänengrenzen der Genloci, es gibt aber auch intronische S/MARs (Cockerill et al. 1987, Jarman und Higgs 1988). Bisher konnten S/MARs unter anderem in Hefen (Amati et al. 1990), in *Drosophila* (Mirkovitch et al. 1984, Gasser und Laemmli 1986), in Säugern (Bode und Maass 1988, Mielke et al. 1990) aber auch in Pflanzen (Dietz et al. 1994, Paul und Ferl 1998) identifiziert werden. Prominente Vertreter sind die S/MAR-Elemente der murinen Immunglobuline (Cockerill et al. 1987), die der Huhn-Lysozymdomäne (Phi-Van und Strätling 1988), die α - β -Globin S/MARs des Menschen (Jarman und Higgs 1988), die Apolipoprotein B S/MARs des Menschen (Levy-Wilson und Fortier 1989) und die humanen α - β -Interferon S/MARs (Bode und Maass 1988, Strissel et al. 1998).

S/MAR-Elemente haben eine Länge von 200-3000 bp und zeichnen sich zumeist durch AT-Reichtum aus, besitzen jedoch keine S/MAR-Konsensussequenz. Dennoch werden S/MAR-Elemente artübergreifend erkannt, was auf eine lebenswichtige Funktion für alle eukaryontischen Zellen hindeutet. Solche Funktionen können unter anderem transkriptionelle Stimulierung (Klehr et al. 1991), Replikationskontrolle (*origins of replication*) (Boulikas 1995) oder DNA-Reparatur und -Rekombination sein (Sperry et al. 1989, Bode et al. 2000a). Ein transkriptionsfördernder Effekt von S/MARs tritt nur nach stabiler Integration ins Genom oder im episomalen Zustand auf, was S/MARs von Enhancern unterscheidet, die auch in transienten Expressionsexperimenten wirken (Klehr et al. 1991, Hörtnagel et al. 1995, Schübeler et al. 1996). Möglicherweise sind viele der mit S/MARs assoziierten Funktionen auf deren architektonische Rolle als Interaktionspartner mit der nukleären Matrix zurückzuführen.

Das Fehlen einer eindeutigen Konsensussequenz erschwert die Identifikation und Vorhersage von S/MAR-Elementen. Trotz des Fehlens von Homologien konnten jedoch einige häufig auftretende Sequenzmotive identifiziert werden. Solche Motive sind Topoisomerase II-Erkennungssequenzen (Käs und Laemmli 1992), ATATTT-Motive (Cockerill und Garrard 1986, Mielke et al. 1990), poly(dAdT)-Bereiche, gebogene DNA-Konformationen (*bending*)

(Anderson 1986, von Kries et al. 1990) und *inverted repeats* (Boulikas 1995). Generell zeigen S/MARs eine hohe Tendenz zur Einzelstrangtrennung (Bode et al. 1992), die von einem *core-unpairing*-Zentrum ausgeht. Auf solchen Sequenzmotiven basieren computergestützte S/MAR-Vorhersagealgorithmen (s.u.).

Im genomischen Kontext spielen S/MAR-Elemente vor allem eine Rolle als Domänengrenzen, die das Genom in topologisch unabhängige Bereiche unterteilen. Veränderungen in der Superhelizität breiten sich über solche Domänengrenzen nicht aus (Zehnbaumer und Vogelstein 1986). Solche S/MARs schirmen eine Domäne von außerhalb liegenden Einflüssen ab, d.h. sie üben eine Art Isolatorfunktion aus (Namciu et al. 1998). S/MARs konnten bisher für eine Reihe von Genen an deren Domänengrenzen nachgewiesen werden (Bode und Maass 1988, Jarmin und Higgs 1988). In dieser Position stellen sie einen Bereich sinkender DNase I-Sensitivität dar, in Übereinstimmung mit einer postulierten Isolatorfunktion. Auch in der Nähe von Promotoren oder von cis-agierenden Elementen wie Enhancern konnten S/MAR-Elemente nachgewiesen werden, unter anderem als Bindungsstellen für Aktivator- oder Repressorproteine (Gasser et al. 1986). In stabilen Transfektionen können S/MARs die Transkriptionsinitiationsraten der integrierten Gene stimulieren (Schübeler et al. 1996).

Darüber hinaus können S/MAR-Elemente die Zelltyp-spezifische Expression einiger Gene beeinflussen (Bonifer et al. 1994). Während der *Xenopus* Embryonalentwicklung sind zum Beispiel die *c-myc* und die 5S Gene über spezifische S/MARs mit der nukleären Matrix assoziiert, wohingegen Keratin nur in adulten Keratinocyten eine Kernmatrix-Assoziation zeigt (Vassetzky et al. 2000). An der Regulation der Zelltyp-abhängigen Expression von Apolipoprotein B im Dünndarm sind S/MAR-Elemente über die Ausbildung einer DNA-Schlaufenstruktur beteiligt, die sich von der in der Leber unterscheidet (Antes et al. 2001). Solch unterschiedliche Strukturierungen können die Chromatinkondensation und damit die Transkription beeinflussen. So ist z.B. bekannt, dass S/MARs mit SAF-A, einem Protein mit einer Histonacetyltransferase-Funktion, interagieren können und somit eine Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren schaffen (Martens et al. 2002).

Die hier dargestellten Funktionen von S/MAR-Elementen verdeutlichen, dass S/MARs diverse Aufgaben im Zellkern übernehmen. Das bedeutet aber nicht, dass alle S/MARs dieselben Funktionen und damit Anwendungspotentiale besitzen.

2.3.3 Der S/MAR-Bindungsassay

S/MARs können über zwei experimentelle Kriterien definiert werden: (1) über die Assoziation endogener DNA-Fragmente mit der nukleären Matrix (*in situ*) und (2) über die Assoziation exogener DNA-Fragmente, die an eine nukleäre Matrix unter Zugabe von Kompetitor-DNA binden können (*in vitro*). Die Isolation der Kernmatrix erfolgt entweder durch eine Hochsalzbehandlung mit 2M NaCl oder durch eine Detergensbehandlung mit Lithium-Diiodosalicylat (LIS) (Abb. 2.3). Im Vergleich zur LIS-Extraktion reflektiert die Hochsalzextraktion zusätzlich den transkriptionellen Status einer Zelle (Vassetzky et al. 2000). Während der Extraktion wird das Chromatin von den nukleosomalen Histonen und anderen löslichen Proteinen befreit und so die DNA für Restriktionsendonukleasen zugänglich gemacht. In der extrahierten Form ist die DNA in Schleifen um die Kernmatrix angeordnet. Diese Schleifen werden über Restriktionsenzyme abgebaut, so dass exogene, zumeist radioaktiv markierte DNA-Fragmente an die Kernmatrix binden können. Dieses Vorgehen wird als *in vitro* Ansatz bezeichnet. Für eine *in situ* Analyse wird nach dem Abbau der Schleifenstruktur direkt mit einer Sonde gegen eine zu untersuchende DNA-Region hybridisiert. In diesem Fall wird

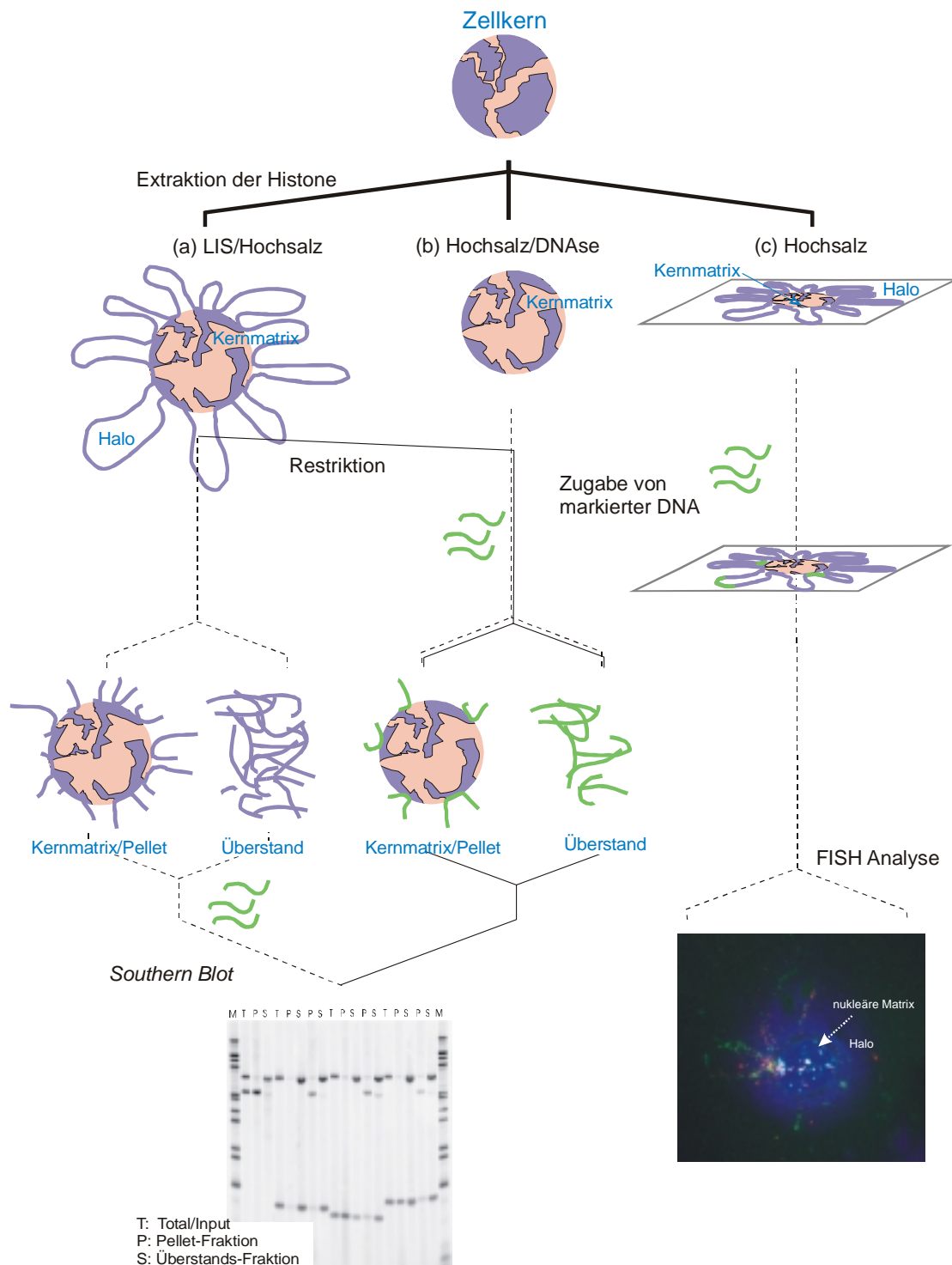


Abb. 2.3 Schematische Darstellung des S/MAR-Bindungsassays

Der linke Ast zeigt den Verlauf einer *in situ* S/MAR-Analyse, wohingegen der mittlere Ast das *in vitro* Verfahren darstellt. Ganz rechts ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zusammengefasst. Bei der *in situ* S/MAR-Analyse werden die DNA-Schleifen nach der Extraktion abgedaut und die endogene DNA über einen *Southern Blot* visualisiert. Der Blot im unteren Teil der Abbildung repräsentiert das typische Ergebnis eines S/MAR-Bindungsassays. Bei der *in vitro* Methode werden zusätzlich DNA-Fragmente zu den Kernmatrix-Präparaten zugegeben. Die Halo-FISH Analyse ist eine Methode, bei der die Zellkerne auf einem Objektträger extrahiert werden. Die Lokalisation von DNA-Fragmenten - ob in der Schleife (Halo) oder an der Kernmatrix - wird über eine Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde bestimmt.

keine DNA von Außen zugegeben (Kay und Bode 1995). Die unterschiedlichen Fraktionen, die Kernmatrix (Pellet) und der nicht-pelletierbare Überstand, werden abschließend getrennt und die Ergebnisse über eine *Southern Blot* Analyse sichtbar gemacht. Die Ergebnisse solcher Bindungsversuche sind in einem Blot in Abbildung 2.3 exemplarisch zu dargestellt: S/MAR-Elemente können in der Pelletfraktion (Kernmatrix) detektiert werden, wohingegen nicht bindende Sequenzen im Überstand zu finden sind.

Ein relativ neuer Ansatz zur Untersuchung von S/MAR-Elementen ist die sogenannte Halo-FISH Methode, die im rechten Teil der Abbildung 2.3 zu sehen ist (siehe auch 2.3.4). Bei dieser Methode werden isolierte Zellkerne vor der Extraktion auf einem Objektträger fixiert. Die Halo-FISH Analyse eignet sich besonders, um eine DNA-Matrix Assoziation in der Zelle real darzustellen.

2.3.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung - FISH

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) sind früher vor allem zur Genmappierung und zu Translokationsstudien an Metaphasechromosomen eingesetzt worden. Anfänglich wurden radioaktiv markierte Sonden verwendet, um bestimmte Zielsequenzen zu identifizieren (Gall und Pardue 1969). Mit der Entwicklung nichtradioaktiver Markierungsmethoden mittels Fluorochromen, Digoxigenin und Biotin ergab sich die Möglichkeit, mehrere DNA-Sequenzen simultan zu detektieren (Task 1991). Das Auflösungsvermögen einer FISH-Analyse hängt von den zu hybridisierenden DNA-Präparaten ab. Liegt die zu untersuchende DNA in der Metaphase vor, sind aufgrund des starken Kondensationsgrades nur DNA-Sequenzen in einem Bereich von 1-3 Mb voneinander trennbar. Eine höhere Auflösung, um die 50-200 kb, kann erreicht werden, wenn für eine FISH-Analyse Interphasezellkerne eingesetzt werden. Eine maximales Trennungsvermögen von 1-200 kb wird erreicht bei der Hybridisierung von linearisierter „nackter“ DNA (vgl. Abb. 2.2: Organisationsstufen des Chromatins, Heng und Tsui 1998).

Die Halo-FISH Analyse ist eine neue Hybridisierungsmethode zur Charakterisierung von S/MAR-Elementen. Der große Vorteil dieser Methode im Vergleich zu klassischen S/MAR-Bindungsansätzen ist, dass zum ersten Mal Schlaufenstrukturen (Halos) und Matrixbindung in der Zelle visualisiert werden können. Bei der Halo-FISH Analyse werden Zellkerne auf einem Objektträger fixiert. Die löslichen Proteine werden über eine 2M NaCl-Hochsalzlösung extrahiert, was zu einer Entfaltung der DNA und damit zur Schlaufenbildung führt. Durch die vorherige Fixierung der Zellkerne auf einer Glasoberfläche minimiert sich das Risiko, dass es zu einer Remodellierung der DNA-Schlaufen während der Extraktion kommt. Die entstehenden DNA-Schlaufen sind an den Matrixproteinen verankert. Über Hybridisierungsexperimente mit spezifischen Sonden kann jetzt gezeigt werden, ob sich eine DNA-Sequenz in der Schlaufenfraktion (DNA-Halo) oder an der Kernmatrix befindet und somit S/MAR-Charakter aufweist. Die DNA Schlaufenstruktur entspricht im Auflösungsvermögen in etwa dem „nackter“ DNA-Fasern (Wiegant et al. 1992, Heng und Tsui 1998). Somit können auch eng benachbarte Sequenzen auf S/MAR-Charakter hin untersucht werden. Lediglich die Auflösung an der Kernmatrix selbst ist aufgrund von DNA-Protein Wechselwirkungen geringer.

2.3.5 Computergestützte Vorhersagen von S/MAR-Elementen

2.3.5.1 Das SIDD-Profil

S/MAR-Elemente sind, wie bereits erwähnt, über einfache Sequenzvergleiche nicht identifizierbar. Traditionell müssen deshalb zu ihrer Ermittlung experimentelle Bindungsstudien durchgeführt werden (s.o., Bode und Maass 1988). Über solche S/MAR-Bindungsstudien können theoretische Vorhersagemodelle bestätigt und weiterentwickelt werden. Eines dieser

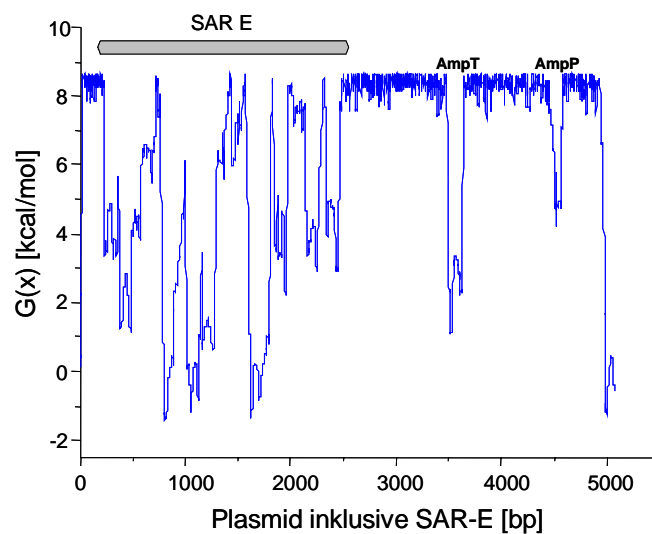


Abb. 2.4 Das SIDD-Profil von pTZ20

In der Grafik ist die freie Energie über der Sequenz aufgetragen. Das Vektorrückgrat ist in den meisten Bereichen stabil mit Ausnahme des Ampicillin-Promotors/Terminators, wohingegen das SAR-E stark destabilisiert ist. Je niedriger der Wert für ΔG ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, einzelsträngige DNA-Bereiche auszubilden.

S/MAR-Elements SAR-E in einem pTZ-Vektorrückgrat. Gut zu erkennen ist das starke Strangtrennungspotential des S/MAR-Elements.

S/MAR-Vorhersagemodelle ist das sogenannte *stress-induced duplex destabilization* (SIDD)-Profil, dessen Berechnung auf der durch Torsionsspannung induzierten Basenpaartrennung in S/MAR-Regionen beruht (Benham et al. 1997). Das SIDD-Profil berechnet die Stabilität der DNA-Doppelhelix und ermöglicht die Identifizierung jener Loci, die bei der Entstehung negativer Superhelizität - durch zum Beispiel eine voranschreitende Transkription - zur Strangtrennung neigen. Die Berechnung des Profils basiert nicht nur auf den Bindungsenthalpien einzelner Basenpaare, sondern bezieht auch den Einfluss benachbarter DNA-Sequenzen mit ein. S/MAR-Elemente zeigen eine starke Tendenz, einzelsträngige Bereiche auszubilden und korrelieren so gut mit den Peaks in den SIDD-Profilen. Abbildung 2.4 zeigt das S/MAR-Profil des Prototyp

2.3.5.2 Der MAR-Finder

Ein weiteres Programm zur Vorhersage von S/MAR-Elementen ist der MAR-Finder (<http://www.futuresoft.org>) (Singh et al. 1997), der verschiedene charakteristische S/MAR-Motive miteinander kombiniert und ihre Häufigkeit statistisch auswertet. Solche Motive sind u.a. der AT-Gehalt, TG-Reichtum vor allem im 3'UTR von Genen (Boulikas 1993), ATTA-, ATTTA- oder ATTTTA-Motive (Boulikas 1993), Topoisomerase II Restriktionsschnittstellen und gebogene DNA-Konformationen (Mielke et al. 1996). Die aufgelisteten Sequenzmotive können wahlweise in die S/MAR-Analyse mit einbezogen werden. Die Ergebnisse dieser Analysen können grafisch dargestellt werden, ähneln im Aussehen den SIDD-Profilen und stimmen in vielen Fällen mit deren Vorhersagen überein.

2.3.5.3 Der Genomatix S/MARTest

Eine relativ neue Methode zur Vorhersage AT-reicher S/MAR-Elemente ist der S/MARTest der Firma Genomatix (<http://www.genomatix.de>). Die Kalkulationen dieses Programms basieren auf der S/MARt DB Datenbank (Liebich et al. 2002). Aus den dort vorhandenen S/MAR-Sequenzen wird die Nukleotidverteilung der einzelnen S/MAR-Elemente ermittelt und neue potentielle S/MARs über eine Dichteanalyse (*weight matrix*) identifiziert.

2.4 Interferone

2.4.1 Interferone und ihre biologische Funktion

Interferone (IFN) sind Polypeptide, die ursprünglich definiert wurden durch ihre Fähigkeit, in Zellen einen antiviralen Status zu induzieren (Isaacs und Lindenman 1987). Neben einem antiviralen vermitteln die Interferone auch einen antiproliferativen Effekt und üben eine Kontrollfunktion bei der Differenzierung und Proliferation im zellulären Immunsystem aus. Interferone werden aufgrund ihrer biochemischen und molekularen Eigenschaften in zwei Gruppen unterteilt: in Typ I und in Typ II Interferone. In Säugertieren existieren fünf Subtypen der Klasse I Interferone (IFN- α ; IFN- β ; IFN- ω ; IFN- τ , IFN- δ), die alle durch denselben Rezeptor erkannt werden und keine Introns besitzen (Henco et al. 1985). Typ I Interferone werden von fast allen Zellen gebildet, wobei Monozyten und Makrophagen vorwiegend IFN- α produzieren, Fibroblasten dagegen IFN- β . Interferone werden nicht konstitutiv, sondern erst nach der Induktion durch z.B. Viren, doppelsträngige RNA, Lipopolysaccharide oder Cytokine exprimiert. Solch eine differentielle Expression kann durch eine S/MAR-vermittelte Anheftung der DNA an die Proteinmatrix des Zellkerns unterstützt werden (Abb. 2.5, Vassetzky et al. 2000).

Zu den Typ II Interferonen zählt man zur Zeit nur das bei den Säugern identifizierte IFN- γ , welches durch ein einziges Intron-haltiges Gen auf Chromosom 12 kodiert wird. Im Gegensatz zu den Klasse I Interferonen ist es säurelabil, bindet an einen eigenen Rezeptor und wird hauptsächlich in T-Helferzellen gebildet.

2.4.2 Der humane Typ I Interferon-Gencluster

Die humanen Typ I Interferone sind auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (p21-22) in einem Gencluster lokalisiert (Abb. 2.5). Dieser Gencluster besteht aus 15 Genen und 11 Pseudogenen (Diaz et al. 1990). Die Evolution des Genclusters umfasst mindestens zwei Duplikationswellen durch ungleiche Rekombination, eine invertierte Duplikation und zwei Genkonversionsereignisse (Roberts et al. 1998). Die Gruppe der α IFN-Gene (IFNA) setzt sich aus 13 funktionellen Mitgliedern zusammen. Das einzige β IFN-Gen (IFNB1) liegt am telomeren Ende des Clusters und ist durch eine 50%ige Homologie zu den α -Interferonen gekennzeichnet.

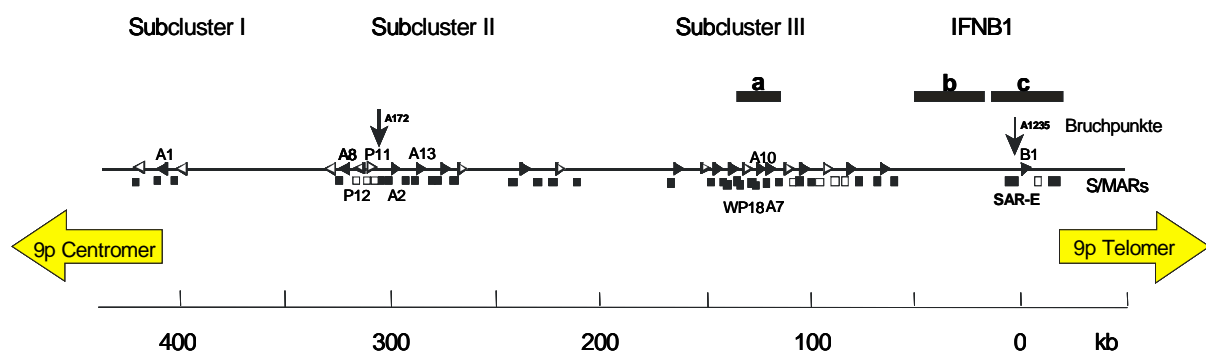


Abb. 2.5 Der humane Typ I Interferon-Gencluster

Der humane Interferon-Gencluster umfasst vier Gengruppen (Subcluster I-III, IFNB1), die eine Reihe von S/MAR-Elementen besitzen. Die Gene selbst sind durch schwarze Dreiecke, Pseudogene durch weiße dargestellt. Starke S/MARs werden durch eine schwarze Box symbolisiert, wohingegen schwache S/MARs durch eine weiße Box angezeigt werden. Die genomischen Bruchpunkte A172 und A1235 kolokalisieren mit starken S/MAR-Elementen. Die Balken a-c stellen die Genbereiche dar, die in dieser Arbeit besonders eingehend untersucht worden sind.

Von den ω -Interferonen (IFNW) gibt es nur noch einen funktionellen Vertreter - das IFNW1 - welches nahe dem IFNB1-Gen lokalisiert ist. Die 11 Pseudogene gehen vor allem auf die ω -Subfamilie zurück. Im gesamten Genclusterbereich konnten über grobe Bindungsstudien einige S/MARs identifiziert werden, deren Funktionen noch nicht weiter spezifiziert wurden (Bode und Maass 1988, Strissel et al. 1998). Präzise Grenzen, Lokalisationen und Bindungsstärken der einzelnen S/MAR-Elemente waren bis zum Anfertigen dieser Arbeit nicht bekannt (Goetze et al. 2003).

2.5 Chromatindomänen und Transgenintegration

Die stabile Expression eines Transgens ist von besonderem Interesse vor allem für gentherapeutische Anwendungen. Solch eine stabile Expression wird entscheidend vom chromosomalen Kontext beeinflusst. Cis-agierende Elemente wie Enhancer, Locus-Kontroll-Regionen (LCRs) (Li et al. 1999), Isolatoren (Bell et al. 2001) und S/MARs haben einen Einfluss darauf, ob ein eingebrachtes Transgen stabil transkribiert oder abgeschaltet wird. Säugerzellen integrieren Fremd-DNA zumeist über einen zufälligen Integrationsmechanismus in bereits vorhandene DNA-Strangbrüche (Scangos und Ruddle 1981, Bode et al. 2000b). Für solch eine unspezifische Integration wird so gut wie keine Sequenzhomologie benötigt. Dieser unspezifische Integrationsmechanismus wird angenommen für herkömmliche Gentransfermethoden wie der Calciumphosphat-Transfektion oder der Elektroporation.

Im Falle der retroviralen Infektion wird eine nicht-homologe Integration in das Wirtsgenom über die retrovirale Integrase katalysiert (Shih et al. 1988). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass der Integrationsort nur vom Zufall abhängt, da das Genom aufgrund von Heterochromatisierung nicht überall gleich gut zugänglich ist. Darüber hinaus sind Retroviren darauf angewiesen sind, dass nach dem Einbau eine Expression des Provirus erfolgt (Scherdin et al. 1989). Tatsächlich konnte bei der retroviralen Infektion eine Präferenz für S/MAR-Elemente als Integrationsorte beobachtet werden (Mielke et al. 1996). Ob deren S/MAR-Funktion aber auch nach der Integration von Fremd-DNA erhalten bleibt und somit eine stabile Transgen-Expression gewährleistet ist, war bis zur Durchführung dieser Arbeit fraglich. Retroviral infizierte Zellen scheinen eine Transgenexpression nicht so schnell abzuschalten wie elektroporierte, was ein erster Hinweis auf den Erhalt der S/MAR-Funktion des Integrationsortes auch nach einer Integration von Fremd-DNA ist (Baer et al. 2000).

3. Ergebnisse

Ziel dieser Doktorarbeit war die detaillierte Analyse von DNA-Kernmatrix Interaktionen. S/MAR-Elemente in großem Umfang zu mappieren und zu charakterisieren war bis dato nur eingeschränkt möglich, da keine intergenischen Sequenzen zur Verfügung standen, um S/MAR-Vorhersagemodelle anwenden zu können. Dieser Status quo hat sich mit dem Voranschreiten des Humangenomprojektes geändert. Immer mehr intergenische Bereiche sind sequenziert, auf die die in der Einleitung vorgestellten S/MAR-Vorhersagealgorithmen angewandt werden können. So kann eine Vorauswahl der experimentell zu testenden Sequenzen getroffen werden. Andererseits können die Vorhersagemodelle aufgrund der anfallenden experimentellen Daten verifiziert und weiterentwickelt werden. Diese Weiterentwicklung birgt das Potential, funktionelle Gendomänen zu erkennen und vorherzusagen. Solch eine detaillierte Funktionsanalyse unter Zuhilfenahme biomathematischer Ansätze war eine der Aufgaben dieser Arbeit.

Ein weiterer Punkt, der im Rahmen dieser Doktorarbeit näher untersucht werden sollte, war die DNA-Kernmatrix-Interaktion in der Zelle mittels Halo-FISH. Dazu wurden zum einen Zelllinien mit einer unterschiedlichen Kopienzahl der IFNB1-Domäne eingesetzt. Zum anderen wurden Klone untersucht, die über eine retrovirale Infektion bzw. Elektroporation generiert wurden und eine Kopie des retroviralen Expressionsplasmids pM5 β geo enthalten. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im zweiten Teil des Kapitels erläutert.

3.1 S/MAR-Elemente im humanen Typ I Interferon-Gencluster

Das „SAR-E“ Element 5' vom humanen IFNB1-Gen war eines der ersten S/MAR-Elemente, dessen Funktionen näher charakterisiert wurden. Mit dem SAR-E sind unter anderem ein starkes Kernmatrix-Bindungsverhalten (Mielke et al. 1990), DNase I Hypersensitivität (Bode et al. 2000a) und eine erhöhte Transgenexpression in Standard-Transfektions-experimenten assoziiert (Mielke et al. 1990, Klehr et al. 1991). Biochemische Analysen zeigen, dass das SAR-E ein hohes Potential zur Einzelstrangbildung besitzt (Mielke et al. 1990, Bode et al. 1992), welches auch im SIDD-Profil reflektiert wird (Abb. 2.4).

Die IFNB1-Domäne wird durch zwei starke S/MARs flankiert, 5'-proximal durch SAR-E und 3'-terminal durch SAR-I, welches ein ähnlich hohes Bindungspotential besitzt wie SAR-E. Die beiden S/MAR-Elemente sind als grüne Balken über dem SIDD-Profil der IFNB1-Domäne in Abbildung 3.1 eingezeichnet. Die ersten im oberen Teil der Abbildung dargestellten S/MAR-Kartierungsexperimente der Domäne (rote Kurve in Abb. 3.1) wurden mit herkömmlichen Eco RI bzw. Bgl II restriktionsverdauten Fragmenten gemacht, die *in vitro* zur Kernmatrix zugegeben wurden (siehe Abb. 2.3; Bode und Maass 1988). Die Auswahl der Fragmente ist damit zufällig und hängt von dem Vorhandensein einer passenden Restriktionsschnittstelle ab. Ein Destabilisierungspotential wird dabei nicht berücksichtigt. Generiert man daher, z.B. über PCR, Fragmente, die mit den Minima im SIDD-Profil exakt übereinstimmen, stellt man fest, dass man voneinander abweichende Bindungsdaten erhält. Ein gutes Beispiel dafür ist das Fragment F. Dieses Fragment enthält neben der kodierenden Region des IFNB1-Gens (cds) auch dessen flankierende Promotor- und Terminatorbereiche (P-B1 und T-B1). Als komplette Sequenz zeigt das F-Fragment keine Matrix-Assoziation (siehe roter Balken in Abb. 3.1). Dieses Erscheinungsbild ändert sich, wenn einzelne Fragmente aus dem

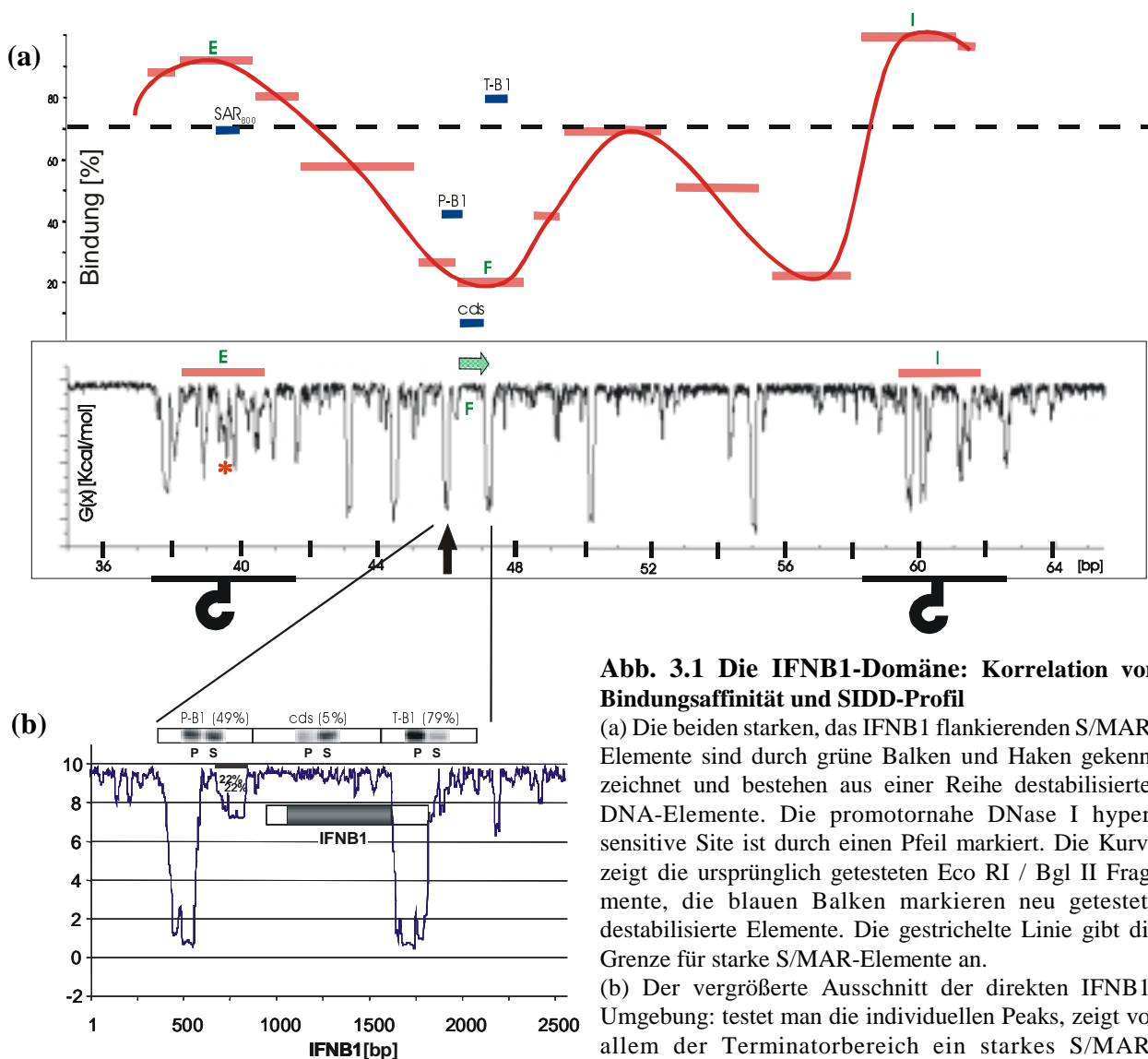


Abb. 3.1 Die IFNB1-Domäne: Korrelation von Bindungsaffinität und SIDD-Profil

(a) Die beiden starken, das IFNB1 flankierenden S/MAR-Elemente sind durch grüne Balken und Haken gekennzeichnet und bestehen aus einer Reihe destabilisierter DNA-Elemente. Die promotornähe DNase I hypersensitive Site ist durch einen Pfeil markiert. Die Kurve zeigt die ursprünglich getesteten Eco RI / Bgl II Fragmente, die blauen Balken markieren neu getestete destabilisierte Elemente. Die gestrichelte Linie gibt die Grenze für starke S/MAR-Elemente an.

(b) Der vergrößerte Ausschnitt der direkten IFNB1-Umgebung: testet man die individuellen Peaks, zeigt vor allem der Terminatorbereich ein starkes S/MAR-Bindungspotential. Die Bindungsdaten sind über der SIDD-Kurve aufgetragen. Der weiße Kasten symbolisiert die mRNA des IFNB1-Gens, der graue die *cds*.

P: Pellet; S: Supernatant, Überstand

Bereich getestet werden: während die kodierende Region des IFNB1-Gens keine Bindung zeigt, besitzt die benachbarte Promotorregion eine 22%ige Matrixaffinität. Zieht man zur Analyse die benachbarte DNase I hypersensitive Site hinzu (Bode et al. 2000b), erreicht diese Affinität einen Wert von 49%. Am 3'-Terminus bindet die Terminatorregion T-B1 inklusive Polyadenylierungssite zu einem Prozentsatz von 79% an die Kernmatrix. Die Ergebnisse dieser Bindungsversuche sind in dem vergrößerten Ausschnitt in Abbildung 3.1b zu sehen. Auch für die Größenreduktion von S/MAR-Elementen ergibt sich ein interessanter Aspekt: testet man zum Beispiel die *core-unwinding* Region des SAR-E Elements, welche auch als SAR₈₀₀ bezeichnet wird und in dem SIDD-Profil der Abbildung 3.1 durch einen roten Stern markiert ist, beobachtet man ein um ca. 30% geringeres Bindungspotential als für das gesamte SAR-E Element.

Diese Ergebnisse verdeutlichen zwei grundsätzliche Effekte: (a) ein zentrales Fragment

aus einem S/MAR-Element verliert an Bindungspotential, wenn die Anzahl an DNA-Fragmenten reduziert wird, die zum Einzelstrangbildungspotential beitragen (vgl. SAR-E - SAR₈₀₀); (b) enthalten getestete S/MAR-Elemente zusätzlich DNA, die kein S/MAR-Potential besitzt, erhöht sich ihr Kernmatrix-Bindungspotential, wenn diese nicht S/MAR-Anteile entfernt werden (vgl. F-Fragment - T-B1). Diese S/MAR-Bindungsergebnisse zeigen die Probleme auf, die beim Identifizieren und Mappieren von S/MAR-Elementen aufgrund fehlender Vorhersage- und Auswahlkriterien in der Vergangenheit häufig auftraten. So sind vor allem schwächere S/MAR-Elemente wegen einer zufälligen Auswahl der zu testenden Fragmentgrößen in Reassoziationsexperimenten bisher nicht erkannt worden.

Die hier dargestellten Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit von zuverlässigen Vorhersagealgorithmen. Eines der Ziele diese Arbeit war deshalb die Verifikation der SIDD-Profil als ein solcher Algorithmus. Dazu wurden die Reassoziationsanalysen zunächst auf die WP18A10A7 Interferondomäne ausgedehnt (Lokalisation siehe Kasten in Abbildung 2.5). Die Ergebnisse dieser Reassoziationsversuche - *Southern Blot* Ausschnitte der *in vitro* Bindungsassays, SIDD-Profil und die statistische Auswertung der Bindungsstärken - sind in Abbildung 3.2 zusammengefasst. Sieben individuelle SIDD-Peaks mit Einzelstrangbildungspotential wurden *in vitro* mehrfach getestet, zusätzlich wurden stabile DNA-Regionen als Negativkontrollen eingesetzt. Die zu untersuchenden DNA Fragmente wurden in den

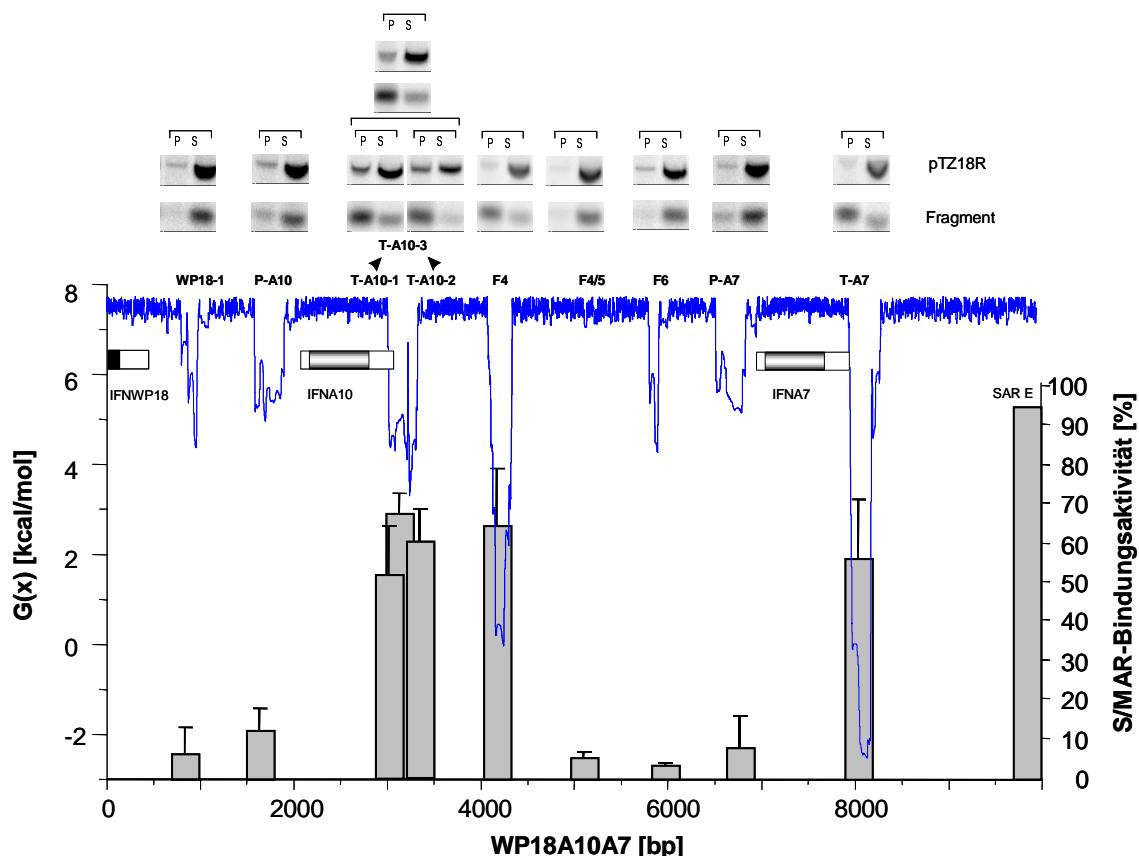


Abb. 3.2 SIDD-Profil und *in vitro* Bindungsdaten der WP18A10A7-Domäne

Die Ergebnisse der *in vitro* Analysen sind in Ausschnitten im oberen Teil der Abbildung dargestellt, die grafische Auswertung dieser Analysen ist in dem Balkendiagramm unterhalb der SIDD-Kurve zu sehen. Die Korrelation zwischen Vorhersage und Reassoziationsanalyse ist deutlich erkennbar. Auffällig ist, dass funktionelle Gene (grau melierte Kästen) von destabilisierten Fragmenten flankiert werden, wohingegen dem Pseudogen IFNWP18 (schwarzer Kasten) dieses strukturelle Element fehlt. Die Messwerte sind auf das Standard SAR-E Element (95% Bindungsaktivität) normiert.

P: Pellet; S: *Supernatant*, Überstand; pTZ18R: Plasmid-Negativkontrolle

pTZ18R Vektor kloniert, der gleichzeitig als nicht-bindende DNA-Kontrolle diene. Als Positivkontrolle fungierte das zu 95% bindende SAR-E Element.

Tatsächlich zeigen alle vorhergesagten destabilisierten DNA-Fragmente eine Affinität zur nukleären Matrix, während stabile Bereiche nicht mit der Kernmatrix interagieren. Auffällig ist, dass die kodierenden Regionen der funktionellen IFNA-Gene jeweils von destabilisierten Fragmenten flankiert werden, wobei die Kernmatrix-Affinität der Terminatorregionen deutlich höher ist als die der Promoterregionen. Solche destabilisierten Bereiche findet man nicht für das Pseudogen IFNWP18, dessen kodierende Sequenz durch Stopcodone unterbrochen ist.

Ein Charakteristikum von „Standard“ S/MAR-Elementen ist die Additivität der Einzelstrangbildungspotentiale. Um zu überprüfen, ob sich Terminatorbereiche vergleichbar verhalten, wurde der IFNA10 Terminator in zwei Bereiche unterteilt - T-A10-1 und T-A10-2 - und beide Teilbereiche einzeln getestet (Abb. 3.2). Tatsächlich reduziert sich das Bindungspotential des Gesamtbereichs T-A10-3 von 69% auf 60% bzw. 52%, das S/MAR-Bindungspotential der Einzelpeaks bleibt jedoch erhalten. Damit konnte eine Additivität der Terminatorfragmente nachgewiesen werden.

Terminatorbereiche verhalten sich also in diesem Test wie Standard S/MAR-Elemente. Ob sie auch ihren Bindungsplatz an der Kernmatrix mit Standard-S/MARs teilen, wurde über Kompetitionsversuche getestet. Dazu wurde das S/MAR-E Element mit den jeweiligen Terminatorfragmenten bzw. dem Fragment F4, welches zwischen den Genen IFNA10 und IFNA7 lokalisiert ist, koinkubiert. Die S/MAR-Bindungsaktivitäten der kurzen Fragmente konnten so von 56%-65% auf 13%-16% reduziert werden (Daten nicht gezeigt, Goetze et al. 2003). Die getesteten DNA-Sequenzen konkurrieren also mit einem Standard S/MAR-Element um vorhandene Bindungsplätze an der Kernmatrix. Dabei scheinen das Fragment F4 und die Terminatorsequenzen jedoch deutlich schwächer zu binden als das Standard SAR-E. Eine

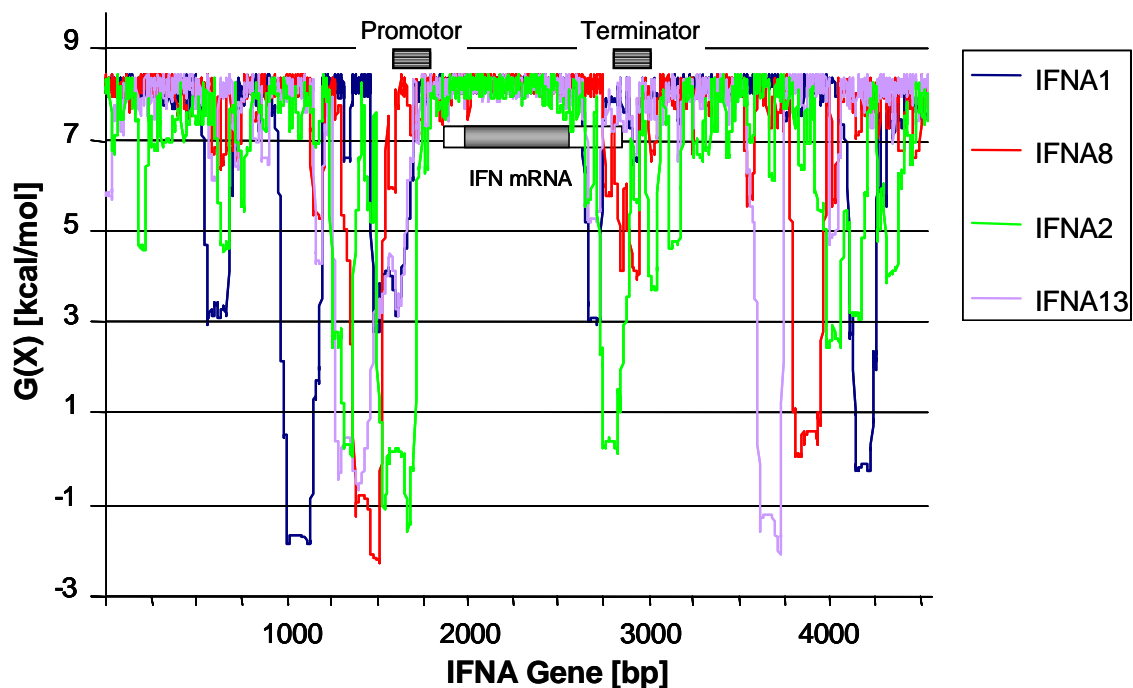


Abb. 3.3 SIDD-Profil der IFNA-Gene A1, A2, A8 und A13

Die SIDD-Profile zeigen deutlich das Destabilisierungspotential der Promotor- und Terminatorregionen der Gene. Bei den gezeigten Beispielen überlappt der Promotor mit benachbarten destabilisierten DNA-Elementen. Der Genbereich an sich ist stabil.

Begründung dafür wäre unter anderem, dass Terminatoren nicht konstitutiv, sondern nur bei einer aktiven Transkription, mit der Kernmatrix assoziiert sein müssen.

Bis dato deuten die hier gezeigten Ergebnisse daraufhin, dass die Destabilisierung eine generelle Eigenschaft von Promotor- und Terminatorsequenzen ist. Dieses Resultat stimmt mit früheren Untersuchungen bei Hefen überein (Benham 1996). Um den Sachverhalt weiter zu untermauern, haben wir unsere Reassoziationsversuche auf die Interferongene IFNA1 und IFNA2 ausgeweitet. Vor allem das IFNA2 Gen liegt laut Vorhersage in einer sehr stark destabilisierten Region, wie die Kurve in Abbildung 3.3 zeigt. Reassoziationsanalysen bestätigten auch in diesem Fall die Vorhersage (Daten nicht gezeigt). Die erweiterte Promotorregion des IFNA2-Gens (Fragment P-A2) zeigt eine Bindungsaffinität von 50%, der extendierte Terminator T-A2(2) eine von 82%. Etwas geringere Affinitäten wurden für den IFNA1-Terminator gemessen (siehe Werte in Tabelle 3.1).

Vergleicht man die SIDD-Vorhersageprofile von den Interferongen IFNA1, IFNA2, IFNA8 und IFNA13, fallen für diese Gene Überlappungen der Promotorbereiche mit weiteren destabilisierten Peaks auf (Abb. 3.3). Die kodierende Region dagegen enthält keine destabilisierten Elemente. Eine herkömmliche Hypothese zur Erklärung der Stabilität kodierender Regionen ist, dass sich ansonsten Sekundärstrukturen bilden können, die ein Voranschreiten der Polymerase verhindern (Benham et al. 1996). Ein Profil mit destabilisierten Promotoren und Terminatoren und einer stabilen kodierenden Region scheint universell für alle funktionellen Gene zu sein.

Anders sieht dieses Erscheinungsbild bei Pseudogenen aus, wie in Abbildung 3.4 dargestellt. Hier zeigt sich, dass Einzelstrangbildungspotential nach dem Verlust der Genfunktion verloren gehen kann. Sowohl dem Pseudogen IFNWP18 als auch dem Pseudogen IFNP12 - einem anderen nicht funktionellen Gen aus dem IFN-Gencluster - fehlt ein Teil an Destabilisierungspotential in unmittelbarer Umgebung. Das Pseudogen IFNP11 andererseits hat

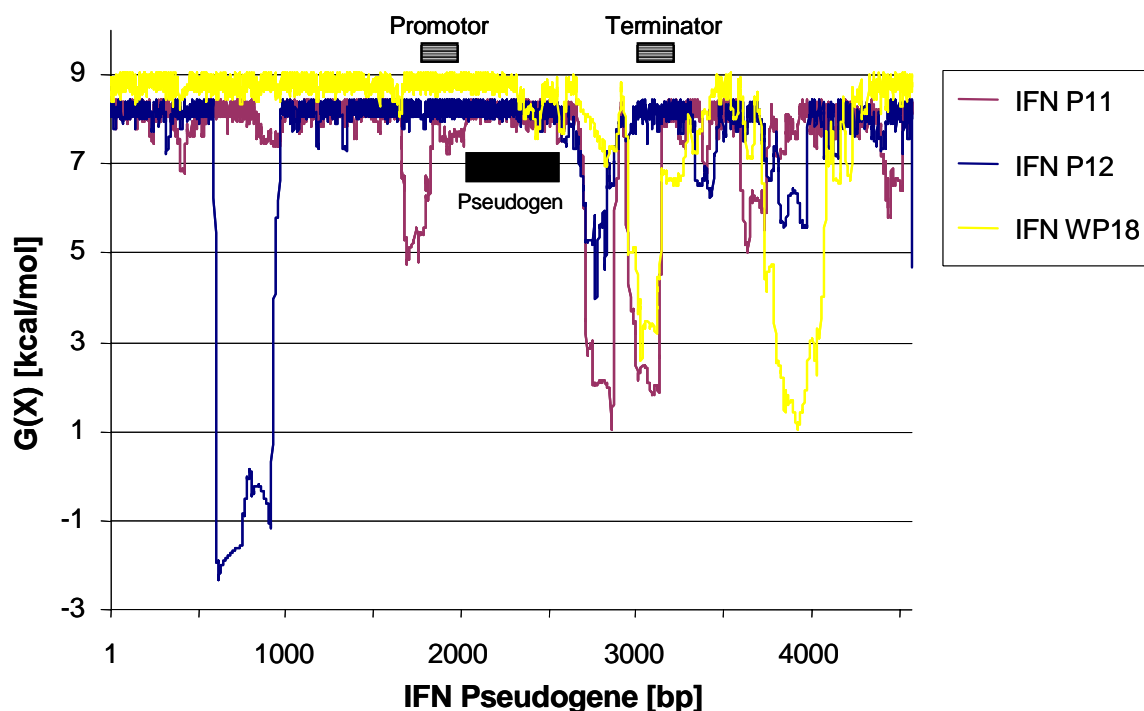


Abb. 3.4 SIDD-Profil der IFN-Pseudogene P11, P12 und WP18

Die Pseudogene zeigen eine Tendenz, flankierendes Strangtrennungspotential zu verlieren. Besonders auffällig ist dieser Trend für den Promotorbereich der Pseudogene IFNWP18 und IFNP12.

dieses Potential teilweise sowohl für den Promotor als auch für den Terminator erhalten. Dennoch sind die kalkulierten ΔG -Werte aller destabilisierter Sequenzen, die Pseudogene flankieren, deutlich höher als die, die funktionelle Gene umgeben. Das spiegelt sich auch in S/MAR-Bindungsanalysen wieder. So zeigt zum Beispiel der verbliebene IFNWP18-Terminatorpeak keine signifikante Affinität zur Kernmatrix (siehe Abb. 3.2).

Die Ergebnisse der S/MAR-Bindungsstudien sind in der Tabelle 3.1 zusammengestellt.

| Elemente | AT-Gehalt [%] | Fragmentgröße [bp] | S/MAR-Bindungsaktivität [%] |
|----------------------------------|---------------|--------------------|-----------------------------|
| Standards | | | |
| SAR-E | 69,2 | 2200 | <u>95</u> |
| SAR ₈₀₀ | 69 | 858 | 70 |
| WP18A10A7-Bereich | | | |
| WP18-1 | 73,7 | 333 | 7 |
| P-A10 | 75,5 | 443 | 12 |
| T-A10-1 | 72,3 | 328 | 52 |
| T-A10-2 | 73,8 | 290 | 60 |
| T-A10-3 | 72,8 | 583 | 69 |
| F4 | 72,7 | 372 | 65 |
| F4/5 | 62,9 | 463 | 5 |
| F6 | 70,8 | 308 | 3 |
| P-A7 | 77,1 | 429 | 8 |
| T-A7 | 75,6 | 508 | 56 |
| Promotoren / Terminatoren | | | |
| T-A1 | 65,2 | 2066 | 67 |
| P-A2 | 74,1 | 557 | 50 |
| T-A2(1) | 68,5 | 896 | 24 |
| T-A2(2) | 67,7 | 2275 | 82 |
| P-B1 | 70,9 | 516 | 49 |
| T-B1 | 66,4 | 500 | 79 |

Tab. 3.1 Die S/MAR-Bindungsaktivitäten der genassoziierten destabilisierten Sequenzen

In der ersten Spalte der Tabelle ist der Fragment-Name, in der zweiten der AT-Gehalt der getesteten Sequenzen aufgeführt. Spalten drei und vier beschreiben die Fragmentlängen bzw. die S/MAR-Bindungsaktivitäten. Die Bezeichnungen T-A2(1) und (2) stehen für zwei Fragmente aus dem Terminatorbereich der IFNA2-Gens, wobei das kürzere Fragment komplett in dem längeren enthalten ist.

P: Promotor; T: Terminator; F: Fragment

Die gemessenen S/MAR-Bindungsaktivitäten sind dabei auf die 95%ige Bindung des SAR-E Elements normiert. Zusätzlich zu den Bindungsstärken sind die jeweiligen Fragmentgrößen und der AT-Gehalt in der Tabelle angeführt. Auffällig ist, dass der AT-Gehalt der getesteten S/MAR-Elemente relativ hoch ist, er liegt zumeist bei über 70%. Aufschlussreich ist aber auch, dass der AT-Reichtum allein nicht ausreicht, um S/MAR-Eigenschaften auszumachen. Der AT-Gehalt von P-A7 zum Beispiel beträgt 77,1%, das Fragment bindet jedoch nur sehr schwach an die Kernmatrix. Tatsächlich konnte über artifiziell erstellte S/MAR-Elemente mit unterschiedlichem AT-Gehalt nachgewiesen werden, dass für eine Motiv-unspezifische Bindung von DNA-Fragmenten an die nukleäre Matrix ein AT-Gehalt von über 80% benötigt wird (A. Gluch, Arbeitsbericht 2002).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass dieser hier präsentierte „strukturelle Code“ - destabilisierter Promotor/Terminator-Bereich und eine stabile kodierende Region - universell ist für funktionelle Gene. Bei Pseudogenen, die keinem Selektionsdruck mehr unterliegen, kann dieser Code im Laufe der Zeit verloren gehen.

3.2 S/MAR-Elemente in intergenischen Bereichen des Typ I Interferon-Genclusters

Im 5'-Bereich des IFNB1-Gens, zwischen Subcluster III und IFNB1, befindet sich eine ausgedehnte, Gen-freie DNA-Region (siehe Bereich b in Abbildung 2.5). Diese Region umfasst mindestens 30 kb. Abbildung 3.5 zeigt das SIDD-Profil dieser intergenischen Sequenz. Auffällig sind einige 250-500 bp breite destabilisierte Peaks, die mit einer Periodizität von 3000 bzw. 2x3000 bp wiederkehren. Diese Peaks wurden je nach Lage mit F20 bis F275 bezeichnet. Testet man die destabilisierten DNA-Fragmente in S/MAR-Bindungsstudien, stellt man eine ungewöhnlich starke Kernmatrix-Affinität fest, die mit der von SAR-E vergleichbar ist. Die Bindungsaktivitäten der einzelnen Fragmente sind über dem SIDD-Profil aufgetragen und zusätzlich dazu in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

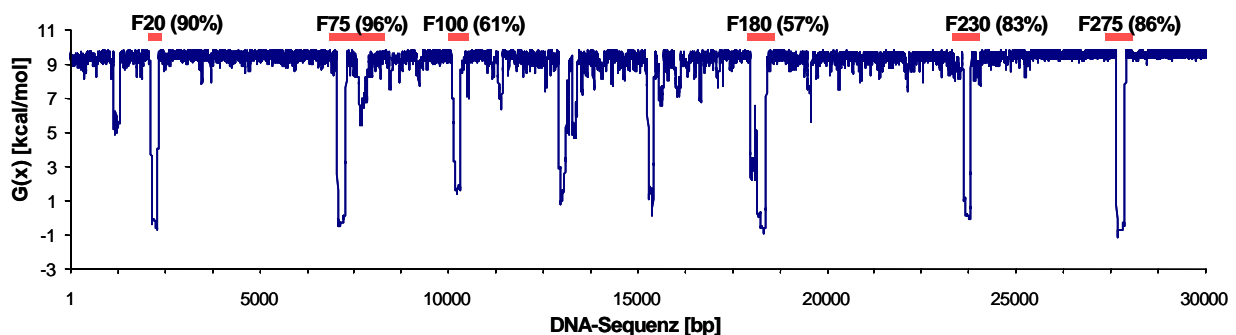


Abb. 3.5 SIDD-Profil der intergenischen DNA-Domäne

Die 250-500 bp breiten destabilisierten DNA-Fragmente treten mit einer Periodizität von 3000-6000 bp auf. Die Bindungsaktivitäten der einzelnen Sequenzen sind über dem SIDD-Profil aufgetragen. Auffällig ist die starke Kernmatrix-Affinität der relativ schmalen Peaks.

Bei der genaueren Analyse der intergenischen S/MAR-Elemente galt das primäre Interesse dem ersten Peak im SIDD-Profil, der besonders prägnant ist und dessen Sequenz F20 eine 90%ige Bindungsaktivität besitzt. Eine detaillierte Analyse von Fragment F20 zeigt, dass dieses Fragment und das Standard SAR-E Element verschiedene Bindungsplätze an der

| Elemente | AT-Gehalt [%] | Fragmentgröße [bp] | S/MAR-Bindungsaktivität [%] |
|--------------------------------|---------------|--------------------|-----------------------------|
| Standard | | | |
| SAR-E | 69,2 | 2200 | <u>95</u> |
| intergenische Sequenzen | | | |
| F20 | 73,4 | 567 | 95 |
| F75 | 73,2 | 1620 | 96 |
| F100 | 70,5 | 526 | 61 |
| F180 | 72,7 | 773 | 57 |
| F230 | 73 | 504 | 83 |
| F275 | 75,7 | 515 | 86 |

Tab. 3.2 Die S/MAR-Bindungsaktivitäten der intergenischen destabilisierten Sequenzen

Das Tabellen-Schema entspricht dem der Tabelle 3.1. Normiert wurden die Bindungsdaten wiederum auf das SAR-E Element. Die Zahl im Fragmentnamen spiegelt die Position in der 30 kb Domäne wieder.

F: Fragment

nukleären Matrix belegen. Die Bindung von S/MARs an die Kernmatrix erfolgt mit einer positiven Kooperativität, das bedeutet, dass lange destabilisierte Fragmente mehr Bindungsplätze belegen und damit Proteine binden als kurze (Mielke et al. 1990, Kipp et al. 2000). Dadurch ist die Bindungskapazität langer S/MAR-Fragmente begrenzt. Für SAR-E geht man von ca. 3000 Bindungsplätzen an der Kernmatrix aus, kleinere S/MARs wie z.B. SAR₈₀₀ oder T-B1, die denselben Bindungsplatz beanspruchen, besitzen ungefähr 15000-30000 Assoziationspunkte (Mielke et al. 1990). Sättigt man diese Standard-S/MAR Bindungsplätze mit SAR-E ab und gibt in einem Fall den IFNB1-Terminator T-B1, im anderen Fall das Fragment F20 hinzu, beobachtet man zwei gegensätzliche Effekte (Abb. 3.6a): (a) die Bindung von T-B1 wird durch das starke SAR-E Fragment behindert => Absättigung der Standard S/MAR-Bindungsplätze; (b) die Bindungscharakteristik von F20 ändert sich bei gleichen Konzentrationen an SAR-E nicht => Beanspruchung anderer Bindungspartner.

Der in Abbildung 3.6a gezeigte Blot verdeutlicht das unterschiedliche Bindungsverhalten der Fragmente. Bei konstanter Menge an SAR-E (200000 cpm pro Ansatz) werden steigende Mengen an Fragment F20 bzw. T-B1 hinzugegeben (200000 cpm, 350000 cpm, 500000 cpm und 650000 cpm). Dabei ist festzustellen, dass das Fragment F20 konstant zu 90% in der Pelletfraktion zu finden ist, also genügend Bindungsplätze zur Verfügung stehen, sich die Verteilung des Fragments T-B1 aber mit steigender Konzentration immer mehr zugunsten der Überstandsfraktion verschiebt. Dieses unterschiedliche Bindungsverhalten ist umso erstaunlicher, als dass sich die SIDD-Profile der beiden Fragmente sehr ähneln (Abb. 3.6b) und die Fragmente eine vergleichbare Größe haben.

Kalkuliert man die sigmoidale Bindungskurve nach Adair (Rohde et al. 1978), erhält man Bindungsaffinitäten für das Fragment F20, die sich um mindestens zwei Größenordnungen voneinander unterscheiden. Diese Unterschiede bestätigen die Existenz einer zweiten Art von DNA-Kernmatrix Interaktion, die anders ist als die herkömmliche. Abbildung 3.6b zeigt die Adair-Bindungskurve von F20, die eine Sättigung bei 15900 (+/-2000) cpm erreicht, was ca.

15000-25000 Bindungsplätzen entspricht, im Vergleich zur Bindungskurve von T-B1. Beide Bindungskurven wurden nach einer Vorsättigung der Kernmatrix-Bindungsplätze mit SAR-E erstellt. Die Adair-Bindungskurve des Fragments T-B1 reflektiert dessen beschränkten Zugang zur nukleären Matrix: eine Sättigung der Kurve wird bereits bei 2500 cpm erreicht.

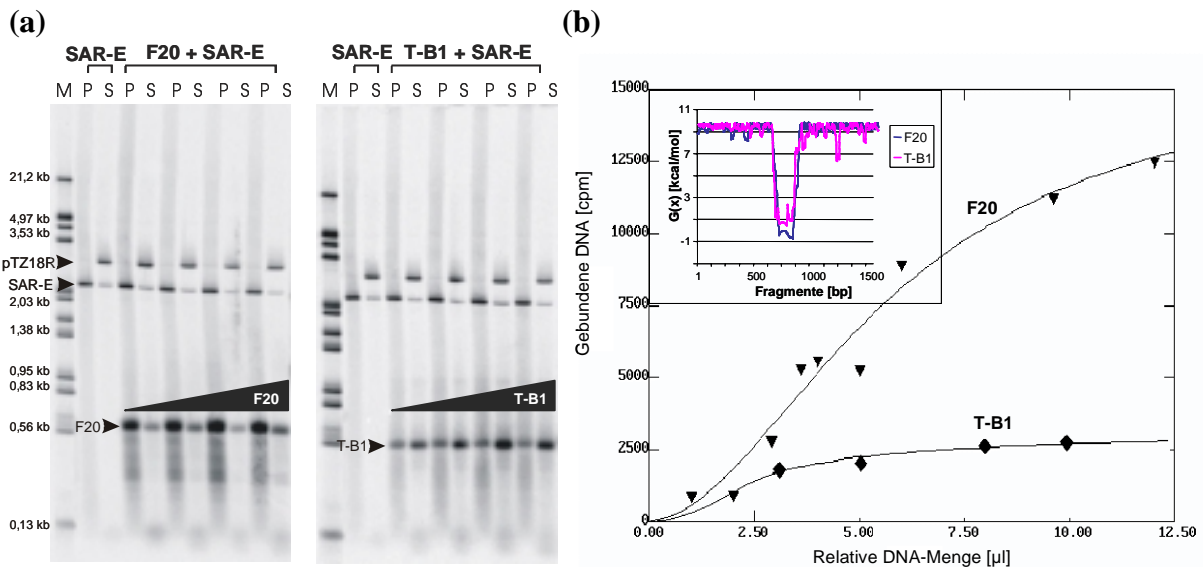


Abb. 3.6 Wettbewerbsversuch der verschiedenen S/MAR-Elemente

(a) Der S/MAR-Bindungsassay mit einer sättigenden Menge an SAR-E zeigt, dass der IFNB1-Terminator (T-B1) mit steigender Menge an DNA im Überstand zu finden ist, wohingegen die Bindung des intergenischen Fragments F20 nicht behindert wird. P: Pellet; S: *Supernatant*, Überstand
(b) Vergleich der SIDD-Profile von T-B1 und F20 und der Bindungskurven in Gegenwart von SAR-E: Die Bindungskurve von T-B1 zeigt einen sigmoidalen Verlauf bei einer Absättigung der Kernmatrix-Bindungsplätze durch SAR-E. Die Bindungskurve von F20 steigt dagegen kontinuierlich und lässt auf 15000 - 25000 zusätzliche Bindungsplätze für das Fragment F20 an der Kernmatrix schließen.

Testet man eine weitere intergenische Sequenz - das Fragment F275 - auf sein Wettbewerbsverhalten bezüglich SAR-E, ergibt sich ein ähnliches Bild wie für das Fragment F20 (Daten nicht gezeigt). Anders als F20 enthält das Fragment F275 zusätzlich eine Reihe von *inverted repeats*, was eine Bildung von stabilen Sekundärstrukturen ermöglicht. Trotzdem ändert sich das offensichtliche Bindungsverhalten des Fragments gegenüber dem von F20 nicht. Beide Sequenzen haben eine ungeheuer starke Affinität zur Kernmatrix. Zieht man zusätzlich zu den SIDD-Profilen Analysen durch die MAR-Finder Software hinzu (siehe 2.3.5.2), so stellt man fest, dass im Vergleich zu anderen S/MARs die hier getesteten intergenischen Bereiche das stärkste S/MAR-Bindungspotential des gesamten IFN-Genclusters besitzen. Die Berechnungen des MAR-Finders für den vollständigen IFN-Gencluster sind in Abbildung 3.7 grafisch dargestellt. Der intergenische Bereich mit den Peaks F20 und F275 ist durch ein Oval gekennzeichnet.

Zur Zeit gehen wir davon aus, dass sich alle analysierten intergenischen Fragmente generell ähnlich verhalten wie die hier im Detail getesteten Sequenzen. Trotz vergleichbarer Fragmentlängen und einem ähnlichen SIDD-Profil zeigen also intergenische Fragmente eine andere Bindungscharakteristik als genassoziierte. Besondere Protein-Bindungsmotive konnten für diese DNA-Bereiche bisher jedoch noch nicht identifiziert werden, entsprechende Versuche sind geplant.

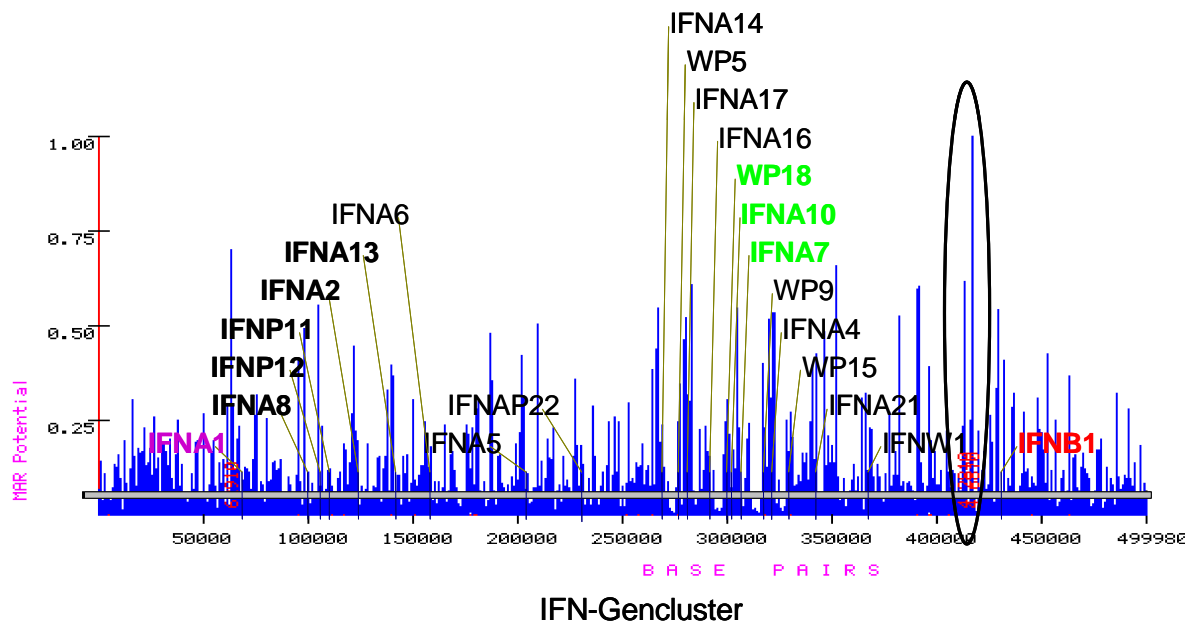


Abb. 3.7 MAR-Finder Analyse des IFN-Genclusters

In der Abbildung ist die MAR-Finder Analyse grafisch dargestellt, indem das MAR-Bildungspotential gegen die Sequenz aufgetragen wurde. Die Lokalisation der IFN-Gene ist eingezeichnet, der untersuchte intergenische Bereich ist durch ein Oval markiert.

Eine andere Möglichkeit, die Wirkung von S/MAR-Elementen zu charakterisieren, ist, ihr transkriptionsförderndes Verhalten in stabilen Transfektionsversuchen zu studieren. Über das Standard SAR-E Element ist bekannt, dass es die Expression stabil integrierter Transgene fördert und einer Inaktivierung entgegenwirkt (Klehr et al. 1991). Die transkriptionsfördernde

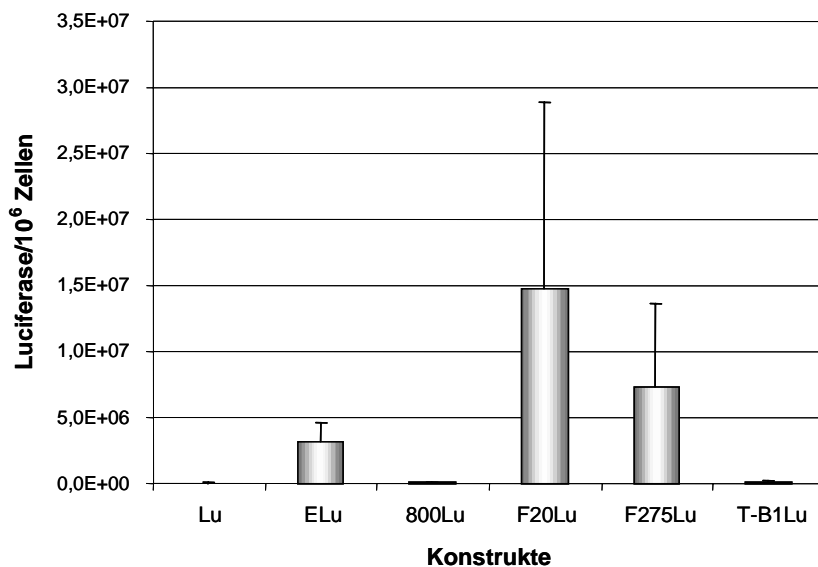


Abb. 3.8 Effekt der intergenischen S/MAR-Elemente auf die Luciferaseexpression in NIH 3T3-Zellen

Das Diagramm verdeutlicht den starken Effekt, den SAR-E, F20 und F275 auf die Expression des Luciferase-Reportergens (Lu) nach einer stabilen Transgenintegration haben. Während die Anwesenheit der starken S/MAR-Elemente die Expression um das 100-500fache erhöht, haben die Elemente SAR₈₀₀ und T-B1 nur einen moderaten transkriptionsfördernden Effekt.

Wirkung, die auch als *augmentation* bezeichnet wird, ist nur nach einer Integration messbar, transient kann ein solcher Effekt nicht beobachtet werden. Das Verhalten in transienten Transfektionsversuchen unterscheidet S/MAR-Elemente von Enhancern, die den transkriptionsfördernden Effekt auch ohne eine stabile DNA-Integration zeigen. Um das Verhalten der intergenischen Fragmente in bezug auf eine Transgenexpression zu studieren, wurden die Fragmente F20 und F275 vor das Reportergen Luciferase kloniert. Die Konstrukte wurden in Maus-Fibroblastenzellen (NIH 3T3) transfiziert und über eine Neomycin-Resistenz stabile Klon-

gemische selektiert. Die Luciferaseexpression der Klongemische wurde über mehrere Passagen gemessen. Die Luciferase-Grundexpression wurde über das Reporterkonstrukt ohne zusätzliches S/MAR-Element bestimmt. Die Ergebnisse dieser Transfektionsversuche sind in Abbildung 3.8 dargestellt. Dabei ist zu sehen, dass die Fragmente F20 und F275 einen deutlichen Effekt auf die Reportergen-Expressionshöhe haben, der noch 2-5mal stärker ist als der des Standard SAR-E Elements. Das IFNB1-Terminatorfragment T-B1 dagegen hat nur einen schwachen Effekt im Vergleich zur Luciferase-Grundexpression, der ähnlich dem des S/MAR-Elements SAR₈₀₀ ist. Im Vergleich zur Grundexpression erhöht sich die Expression des Reportergens durch moderate S/MAR-Elemente wie SAR₈₀₀ oder T-B1 nur um das 2-4fache, bei den starken S/MARs ist ein Faktor von 200-500 messbar. In transienten Expressionsversuchen zeigen die Fragmente F20, F275 und T-B1 keine transkriptionsfördernde Wirkung, sie haben also keine Enhancer-Eigenschaften. Vergleichbare Effekte der Fragmente konnten auch in stabil transfizierten BHK-Zellen gemessen werden, wobei die Expressionserhöhung, die durch die intergenischen Sequenzen erzielt wurde, etwas moderater ausfiel und im Wirkungsbereich des SAR-E Elements lag (Daten nicht gezeigt). In Hinsicht auf die transkriptionsfördernde Wirkung unterscheiden sich die intergenischen S/MARs also nicht vom Standard SAR-E Element.

Eine derart starke Auswirkung auf die stabile Transgenexpression ist für kurze S/MAR-Elemente ungewöhnlich und bisher in dem Umfang noch nicht beobachtet worden. Dieses extreme Verhalten ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei den intergenischen Elementen um eine neue Klasse von S/MARs handelt, die eine sehr starke Kernmatrix-Assoziation vermitteln und deswegen einen starken transkriptionellen Effekt haben. Den hier präsentierten Ergebnissen zufolge detektieren SIDD-Kalkulationen verlässlich jegliche Art von Einzelstrangbildungspotential, welches bei Eukaryonten mit einer Affinität zur nukleären Matrix einhergeht. Spezifische Unterschiede in der DNA-Protein Interaktion werden jedoch nicht erfasst.

3.3 Prokaryontische destabilisierte DNA-Elemente

Die oben gezeigten Ergebnisse belegen, dass sich eukaryontische S/MARs zuverlässig aus SIDD-Profilen ableiten lassen. Auch artifizielle S/MARs, die aus destabilisierten Fragmenten des Eukaryontengenoms aufgebaut sind, lassen sich so nachweisen (Bode et al. 1992, Kay und Bode 1995). Prokaryonten enthalten im Gegensatz zu Eukaryonten keine S/MAR-Elemente, da deren DNA-Organisation weniger komplex ist. Das Prokaryontengenom liegt als ein einziges ringförmiges Molekül in der Zelle vor und ist über einen DNA-Bereich an der Plasmamembran verankert. Dass Prokaryonten keine S/MARs enthalten, lässt sich auch aus den Reassoziationsexperimenten schließen, in denen ein bis zu 100000facher molarer Überschuss an bakterieller DNA (Kompetitor-DNA) das Bindungsverhalten eukaryontischer S/MARs nicht behindert. Trotzdem enthalten prokaryontische Genome destabilisierte Elemente (*unpairing elements*) wie jene am Ampicillin-Gen (siehe Abb. 2.4), die durch Sheflin und Kowalski 1985 beschrieben wurden und zur Entwicklung des SIDD-Prinzips dienten (Benham 1992).

Basierend auf diesen Destabilisierungspotentialen sollten artifizielle S/MARs durch die Oligomerisierung des Ampicillin-Promotors bzw. -Terminators hergestellt werden. Über die Oligomerisierung sollten die *unpairing elements* des Promotors bzw. Terminators angereichert werden. Berücksichtigt wurden dabei bestimmte Abstandsregeln, um eine Kommunikation der Einzelpeaks miteinander zu garantieren (Tsutsui 1998). Bei einem vollständigen Zutreffen des hier abgeleiteten Konzeptes sollten sich die einzelnen Destabilisierungsbeiträge der Monomere addieren und mit dem Oligomerisierungsgrad sollte das S/MAR-Bildungspotential steigen. Von dem 126 bp großen Promotor-Monomer Fragment wurden Oligomere bis zum Oktamer

hergestellt, von dem 161 bp großen Terminator-Fragment wurden Oligomerisierungsgrade bis zum Hexamer erreicht. Dabei entsprechen sich das Promotor-Oktamer und das Terminator-Hexamer in ihren Größen (1008 bp und 966 bp).

Testet man die hergestellten Fragmente in Reassoziationsversuchen, ist ein unerwarteter Trend beobachtbar: während die Promotor-Fragmente mit dem Oligomerisierungsgrad immer stärker an die Kernmatrix binden, ist das bei den Terminatorfragmenten nicht der Fall (Abb. 3.9, Blotausschnitte und grafische Auswertung). Die kleineren Terminatorfragmente „kleben“ noch unspezifisch an der nukleären Matrix, wohingegen die größeren überhaupt nicht mehr binden.

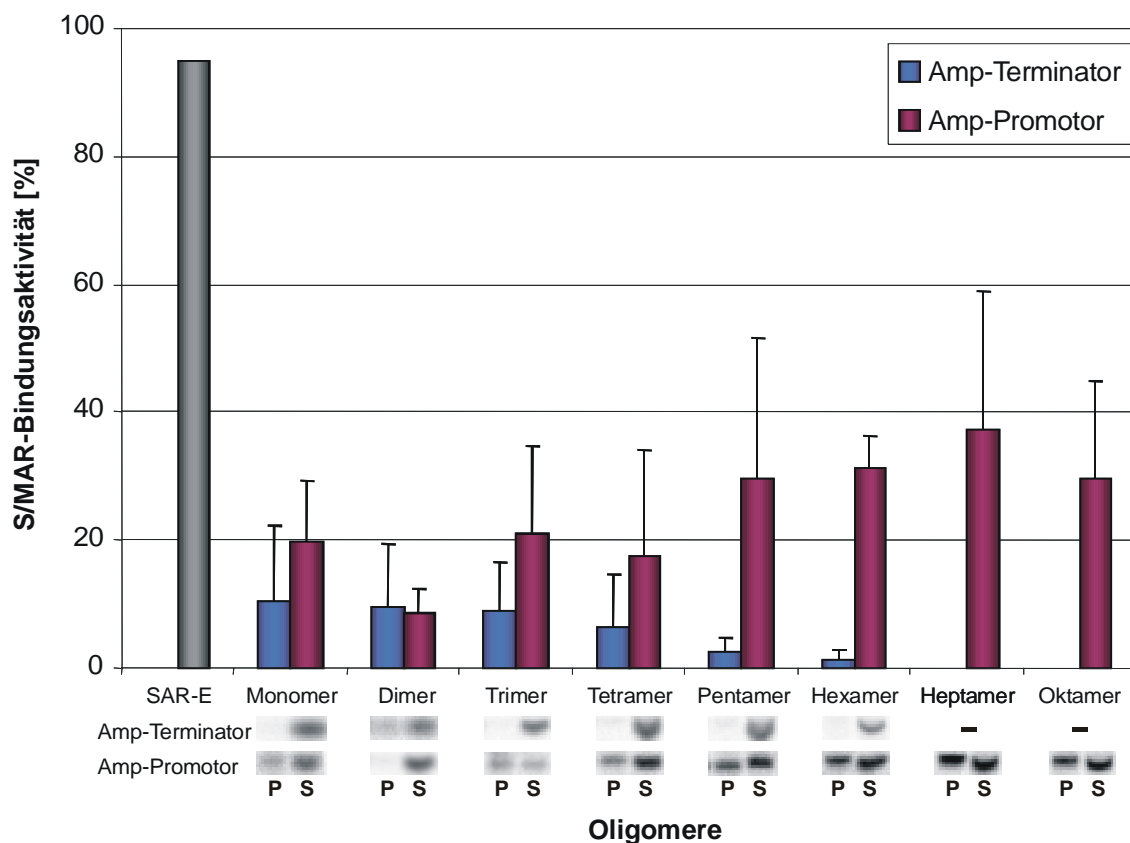


Abb. 3.9 Das Bindungsverhalten der Ampicillin-Promotor/Terminator Oligomere

Die Abbildung stellt das Bindungsverhalten der Oligomer-Konstrukte, normiert auf das SAR-E Element (95%), dar. Während die Ampicillin(Amp)-Promotor Oligomere mit zunehmendem Oligomerisierungsgrad immer stärker an die Kernmatrix binden, zeigt sich bei den Terminator-Oligomeren der gegenteilige Effekt: die kleineren Fragmente „kleben“ unspezifisch zu einem geringen Anteil an der nukleären Matrix, die größeren binden gar nicht. Ausschnitte aus den Reassoziationsversuchen sind im unteren Teil der Abbildung zu sehen.

P: Pellet; S: *Supernatant*, Überstand

Dieses Verhalten ist umso auffälliger, als dass der Terminator ein viel stärkeres Destabilisierungspotential besitzt als der Promotor. Destabilisierungseigenschaften sind also notwendig aber nicht hinreichend, um aktive S/MAR-Elemente zu erschaffen. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen Vorhersage und Beobachtung könnte eine prokaryonten-spezifische Methylierung der GATC- bzw. CC(A;T)GG-Bereiche sein. Beide Motive kommen zahlreich in prokaryontischen, aber nur selten in eukaryontischen Sequenzen vor. Das Anhängen von Methylgruppen an solche prokaryontischen Bereiche könnte die Interaktion zwischen

nukleären Matrixproteinen und den artifiziellen S/MARs nachhaltig behindern. Tatsächlich finden sich zwei eng benachbarte GATC-Sequenzen in dem 161 bp Terminator-Monomer, die in der Promotor-Sequenz nicht auftreten. Testet man allerdings Terminator-Oligomere, die aus Methylase-defizienten Bakterien gewonnen wurden, verändert sich auch in diesem Fall das Bindungsverhalten der artifiziellen Oligomere nicht. Die bakterienspezifische Methylierung ist also für die beobachtete Diskrepanz zwischen Vorhersage und experimentellem Befund nicht verantwortlich. Alternative Erklärungsmöglichkeiten bieten möglicherweise Sekundärstrukturen, die durch das *unwinding* der destabilisierten DNA-Sequenzen verursacht werden (Schroth und Ho 1995). In der Terminator-Sequenz findet sich ein AT-reicher *inverted repeat* (84-97 bp und 104-117 bp), der das Potential besitzt, Haarnadelstrukturen bzw. Kreuzformen zu bilden. Solch ein Sequenzmotiv tritt in der Promotorregion nicht auf. Weiterhin kann das Auftreten von homopolymeren *AT-Patches* eine große Rolle bei der spezifischen Proteinerkennung spielen (Tsutsui 1998). Der S/MAR-Charakter einer Sequenz hängt entscheidend von der Häufigkeit, der Verteilung und dem Abstand dieser AT-Muster voneinander ab. Es ist nicht klar, ob solch ein kompatibles Muster in prokaryontischen DNA-Bereichen auftritt.

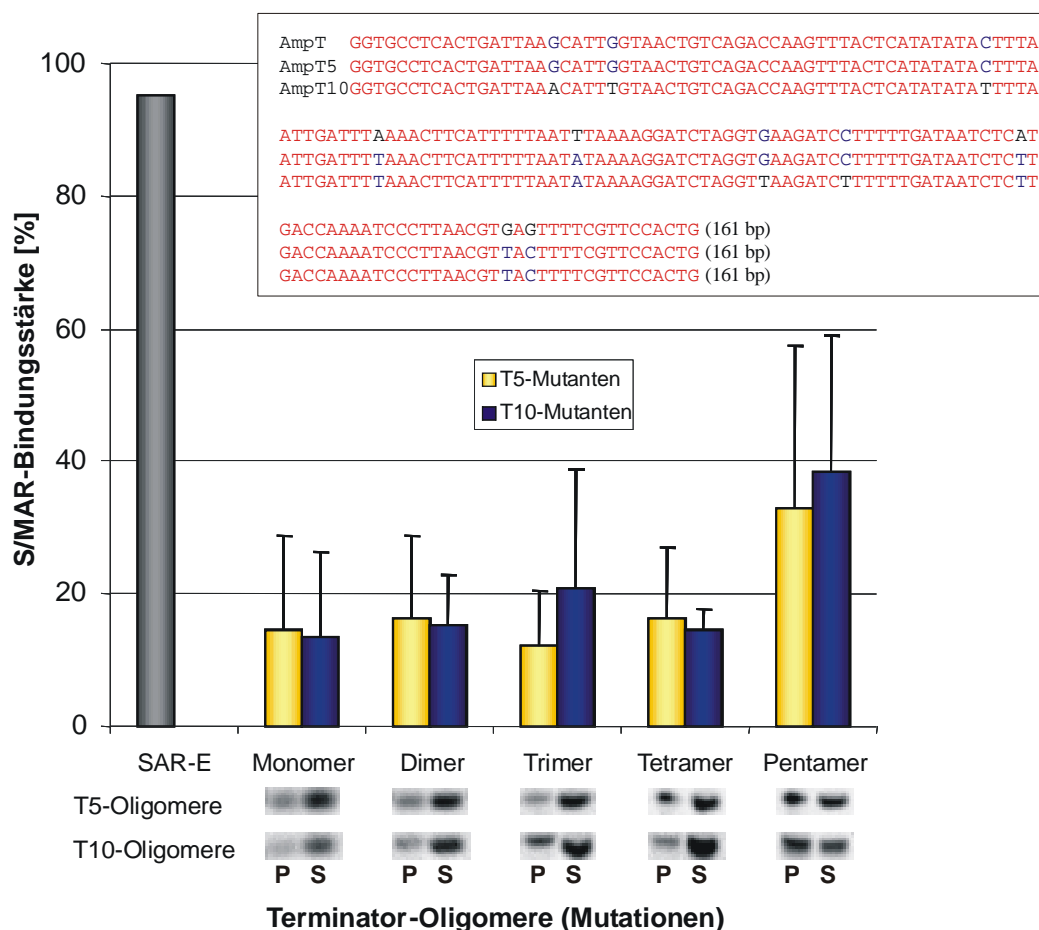


Abb. 3.10 Das Bindungsverhalten der mutierten Terminator-Oligomere

Die S/MAR-Bindungsversuche zeigen, dass die Terminator-Mutanten mit zunehmendem Oligomerisierungsgrad immer stärker an die Kernmatrix binden. Im oberen Teilausschnitt der Abbildung ist die Terminator(T)-Originalsequenz gegen die mutierten Sequenzen T5 und T10 (5 bzw. 10 Mutationen pro 161 bp) aufgetragen. Teilausschnitte der einzelnen Kernmatrix-Bindungsversuche sind unter dem Balkendiagramm dargestellt.

P: Pellet; S: *Supernatant*, Überstand

Als nächster Schritt zur Analyse der S/MAR-Bindungsaktivität wurde das prokaryontische Terminator-Monomer mit den S/MAR-typischen Sequenzen der S/MARt DB Datenbank (Liebich et al. 2002) verglichen und durch minimale Mutagenese diesen angeglichen. Grundlage dafür war der *S/MARTest* der Firma Genomatix, dessen Kalkulationen auf S/MAR-assoziierten Matrizen beruhen (siehe 2.3.5.3). Vergleicht man die Terminator-Sequenz mit diesen Matrizen, finden sich nur geringfügige Ähnlichkeiten zu eukaryontischen Sequenzmotiven. Zu diesem Zweck wurden Punktmutationen entsprechend der S/MAR-assoziierten Muster eingeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass der AT-Gehalt der Gesamtsequenz möglichst wenig geändert wurde. Für die Experimente wurden zwei Varianten mit je fünf Mutationen pro 161 bp bzw. zehn Mutationen pro 161 bp eingesetzt (T5- und T10-Mutante). In der T10-Oligomerreihe wurde durch die eingeführten Mutationen auch der *inverted repeat* zerstört. Die ursprüngliche Terminatorsequenz ist in Abbildung 3.10 gegen die der beiden Mutanten aufgetragen. Den Reassoziationsversuchen zufolge zeigen die mutierten Sequenzen ein anderes Bindungsverhalten als die Terminator Originalsequenz. Ab dem Pentamer ist sowohl für die T5- als auch für die T10-Mutante eine deutliche Matrix-Assoziation erkennbar (Abb. 3.10 Blotausschnitte und grafische Auswertung).

Gleicht man also die prokaryontischen Terminatorsequenzen den eukaryontischen S/MAR-Elementen an, erhält man artifizielle S/MARs, die als Pentamer eine über 50%ige Bindungsaktivität erreichen. Die oligomerisierten Promotorbereiche binden zu einem ähnlichen Prozentsatz ohne die Einführung zusätzlicher Mutationen. Der *inverted repeat* im Terminatorbereich scheint nicht ausschlaggebend für die mangelnde Assoziation der Ursprungssequenz zu sein, da die T5-Mutanten, die das Sequenzmotiv noch enthalten, an die Kernmatrix binden können.

3.4 Visualisierung von S/MAR-Kernmatrix Interaktionen *in situ* mittels Halo-FISH

Die biologischen Funktionen von S/MAR-Elementen in grundlegenden Prozessen wie der DNA-Replikation und -Transkription sind bereits in der Einleitung erläutert worden. Generell akzeptiert ist die Ansicht, dass die Schlaufenbildung über S/MAR-Elemente essentiell für regulatorische Prozesse ist (Hart und Laemmli 1998, Stein et al. 1999). S/MAR-Sequenzen zum Beispiel, die das Matrix-Protein SATB1 binden, befinden sich an der Basis einer DNA-Schleife. In SATB1 defizienten Zellen dagegen sind solche Elemente in der Schleife selbst lokalisiert (de Belle et al. 1998, Cai und Kohwi-Shigematsu 1999). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung ändert sich in SATB1 defizienten Zellen auch die Expression von Genen wie z.B. IL-2R α und IL-7R α (Alvarez et al. 2000). Eine wichtige Fragestellung in diesem regulatorischen Zusammenhang betrifft die Mobilität von *scaffold attachment regions* in der Zelle, wodurch differentielle Expressionsmuster entstehen könnten. Eine solche Mobilität von S/MAR-Elementen kann über die im ersten Teil des Kapitels vorgestellten *in vitro* Experimente nicht gemessen werden. Ob S/MARs konstitutiv mit der Kernmatrix assoziiert sind oder ob sie als alternative Ankersequenzen in einem dynamischen System dienen, wird im folgenden über die *in situ* Halo-FISH Methode analysiert. Um die Frage der Mobilität und damit der differentiellen Genexpression näher zu untersuchen, wurden unter anderem Mauszelllinien mit einer unterschiedlichen Anzahl an stabil integrierten humanen IFNB1-Genkopien mit flankierenden SAR-E Elementen generiert (Gross et al. 1981). Die pCosIFNB-Transgene sind in einer Kopienzahl von 1-80 in einer Tandemanordnung in das Genom der Maus LTK-Zellen

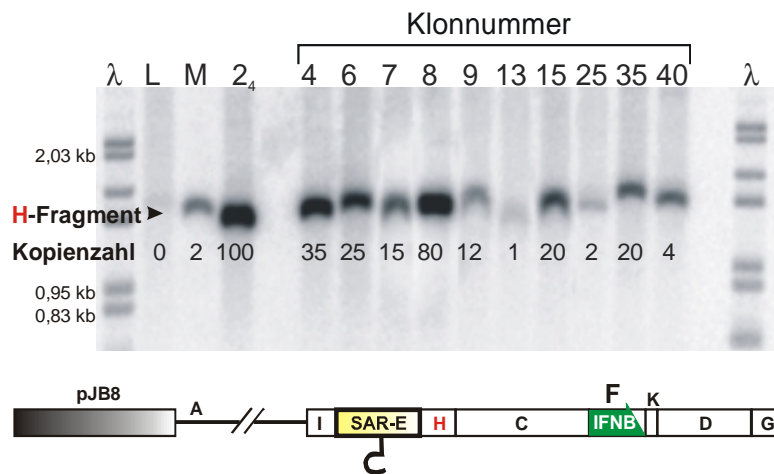


Abb. 3.11 Bestimmung der pCosIFNB-Kopienzahl über Southern Blot Analysen

Der DNA-Blot zeigt die unterschiedliche Kopienzahl der kointegrierten pCosIFNB-Transgene, die über die Hybridisierungssignalintensität des F-Fragments abgeleitet wurde. Als Vergleichswerte wurden die Hybridisierungssignale der humanen diploiden MG63-Zelllinie und der murinen 2₄-Zellen mit 100 Kopien des pCosIFNB-Cosmids herangezogen. Über den Spuren sind die Klonnummern der Klone angegeben, die im folgenden nur noch mit K4-K40 bezeichnet werden. Das transfizierte Cosmid inklusive SAR-E Element und kodierender IFNB1-Region (F-Fragment) ist unter dem Blot schematisch dargestellt.

L: LTK-Zellen; M: MG63-Zellen; 2₄: 2₄-Zellen;

integriert. Dadurch generiert man abgeschlossene DNA-Domänen von ~40 kb, die an beiden Seiten von S/MAR-Elementen flankiert werden. Die Kopienzahl, die Vollständigkeit und die Anordnung der Transgene sind über *Southern Blot* Analysen bestätigt worden. In Abbildung 3.11 ist exemplarisch ein Blot dargestellt, in dem gegen das H-Fragment aus dem pCosIFNB-Cosmid hybridisiert wurde. Die Kopienzahl wurde dabei über die Signalstärke im Vergleich zu humanen MG63- und murinen 2₄-Zellen (2 bzw. 100 Kopien) abgeschätzt. Zusätzlich zu *Southern Blot* Analysen wurde die Kointegration der Transgene für die im Detail ana-

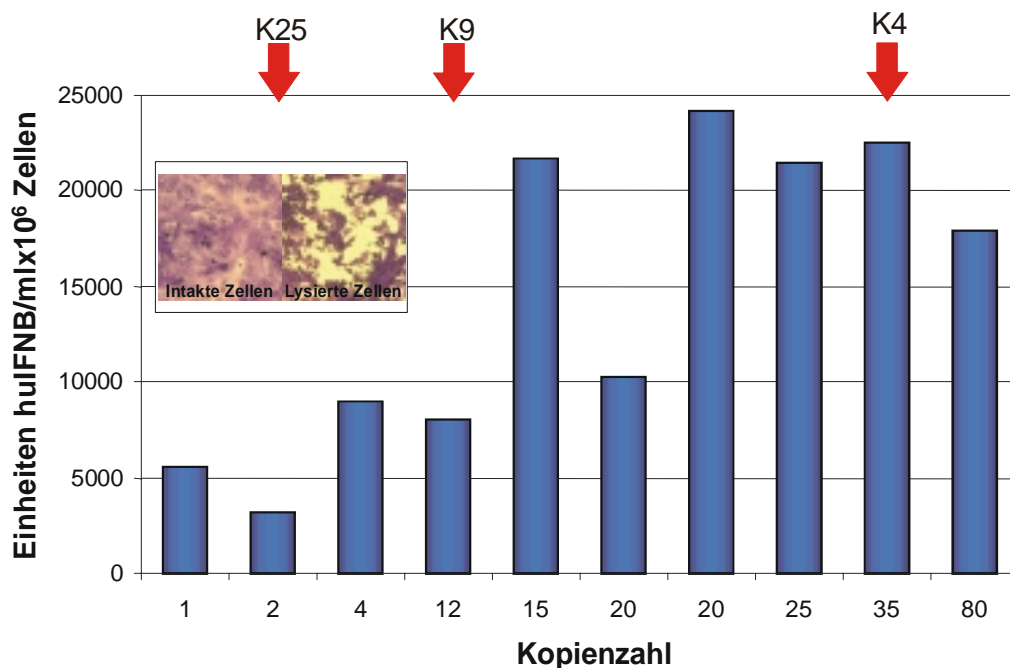


Abb. 3.12 Interferon-Produktion der stabilen pCosIFNB-Klone

Die IFNB1-Transgenexpression wurde mittels Interferontest ermittelt. Anhand der Lyse der nicht-Interferon produzierenden FS4-Testzellen konnte die IFN-Produktion der Klone nach Induktion bestimmt werden (siehe Ausschnitt und 5.10.7). Testet man die IFN-Produktion der Einzelklone, so fällt auf, dass die Expressionshöhe mit der Kopienzahl nicht beliebig zunimmt. Vielmehr scheint bei ca. 20 Kopien eine Art Sättigung erreicht zu werden. Die roten Pfeile kennzeichnen die Klone, die im folgenden näher analysiert wurden.

lysierten Klone über die Hybridisierung von Metaphase-Präparaten bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Betrachtet man das Expressionsverhalten der Klone, so fällt auf, dass die IFNB1-Proteinproduktion nach einer Virus-Infektion zwischen den einzelnen Klonen erheblich variiert (Abb. 3.12). Dabei ist es definitiv nicht so, dass die Expressionshöhe mit der Kopienzahl zunimmt, wie man es teilweise für S/MAR-flankierte DNA-Bereiche beobachtet hat (Dang et al. 2000). Vielmehr gibt es Hinweise darauf, dass eine hohe Anzahl von integrierten Transgenen an einem Chromosom-Locus zur kompletten Abschaltung der Genexpression führen kann (*repeat-induced gene silencing* oder Kosuppression genannt) (Garrick et al. 1998). Diese Inaktivierung von Gen-Domänen könnte unter anderem dadurch erklärt werden, dass eine Bindung der S/MAR-Elemente an die nukleäre Matrix mit einer Erhöhung der Kopienzahl nicht mehr stattfindet und so die integrierten Gen-Kopien keinen Zugang zur Kernmatrix und damit zum Transkriptionsapparat der Zelle haben. Deshalb wurde der *in situ* Assoziationsstatus einiger pCosIFNB-Klone über Halo-FISH Analysen näher untersucht. Die für diese Analysen präparierten DNA-Halos wurden zunächst mittels DAPI angefärbt. War eine klare Kernstruktur erkennbar, wurden die Halo-Strukturen als intakt bewertet (Abb. 3.13a). Die Integrität der DNA-Halos wurde außerdem über Telomer- und Centromer-spezifische Sonden überprüft. Es ist bekannt, dass Telomere mit der Kernmatrix assoziiert sind, wohingegen Centromere keine Kernmatrix-Spezifität zeigen (Rätsch et al. 2002). Diese Verteilung ist gut in den Abbildungen 3.13b-3.13d am Beispiel von MG63 DNA-Halo Hybridisierungen zu sehen.

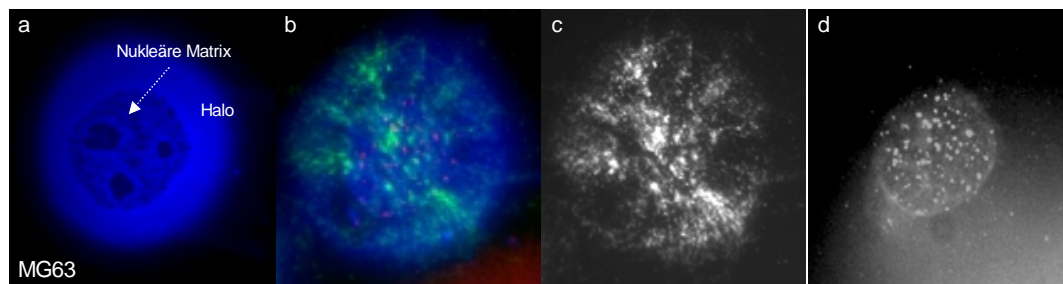


Abb. 3.13 Überprüfung der Integrität von DNA-Halo Strukturen

(a) eine intakte Halo-Struktur am Beispiel von MG63-Zellen: die DNA-Halo, die Nukleoli und die Überreste des Zellkerns sind deutlich zu erkennen; (b) FISH-Experimente mit Centromer-spezifischen (grün) und Telomer-spezifischen (rot) DNA-Sonden: die Beschränkung der Telomer-Signale auf die Kernmatrix ist gut erkennbar; Abbildungen (c) und (d) zeigen die Einzelaufnahmen der in Ausschnitt (b) überlagerten Centromer- (c) und Telomersignale (d).

Für die ersten Analysen wurden die Klone K25 und K9 mit zwei bzw. 12 Transgenkopien herangezogen. Diese Klone sind in Abbildung 3.12 mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Darüber hinaus wurde der Assoziationsstatus von 2_4 -Zellen mit ca. 100 Kopien des pCosIFNB-Cosmids näher betrachtet. Als Sonde wurde das mit Digoxigenin markierte SAR-E Element eingesetzt. Tatsächlich beobachtet man ein unterschiedliches Lokalisationsmuster der transfizierten IFNB1-Cosmide. So finden sich für den Klon K25 mit zwei integrierten IFNB1-Kopien die Transgene in den ausgewerteten DNA-Halos zu 90% ausschließlich an der Kernmatrix. In 10% der Fälle sind die Signale in der Schlaufenfraktion lokalisiert. Diese unterschiedliche Transgen-Verteilung ist ein erster Hinweis auf eine dynamische S/MAR-Kernmatrix Interaktion. Im Vergleich zum Klon K25 sehen die Assoziationsmuster der Klone mit multiplen Kopien anders aus. In den meisten Fällen konnten pro DNA-Halo FISH-Signale

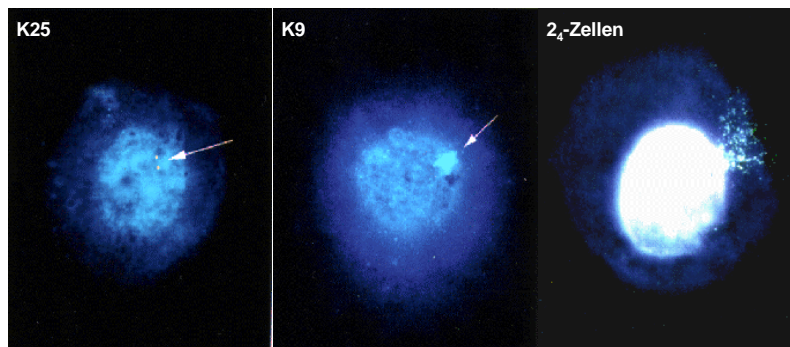


Abb. 3.14 Unterschiedliche Verteilungsmuster der SAR-E Elemente abhängig von der Transgen-Kopienzahl

Das linke Bild zeigt eine exemplarische Aufnahme von dem diploiden Klon K25, dessen Transgenkopien zu einem hohen Prozentsatz an der Kernmatrix zu finden sind. K9 mit ca. 12 Kopien zeigt zumeist eine enge Assoziation zur nukleären Matrix, wohingegen bei 2₄-Zellen ein Großteil der integrierten Kopien in der DNA-Schleife zu finden ist.

sowohl an der Kernmatrix als auch in den DNA-Schleifen detektiert werden. Für den Klon K9 war das in 68% der ausgewerteten Halos, für 2₄-Zellen sogar in 100% der Fall. Die Ergebnisse sind in Ausschnitten in Abbildung 3.14 dargestellt (siehe auch Abb. 4.3). Genetisch identische S/MAR-Elemente verhalten sich also unterschiedlich abhängig von ihrer Kopienzahl. Sind multiple Kopien von S/MAR-Elementen im Genom integriert, dienen nur einige von diesen Sequenzen wirklich

als DNA-Anker. Vor allem bei 2₄-Zellen fällt auf, dass mehr S/MAR-Kopien in der DNA-Halo als an der Kernmatrix lokalisiert sind (Abb. 3.14). Dieser Anteil ist bei den ausgewerteten K9-Halos deutlich geringer. Es gibt vereinzelte Hybridisierungssignale in der DNA-Schleife (ca.

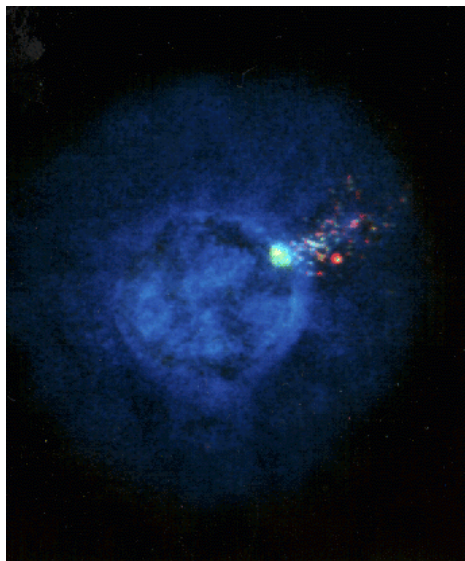


Abb. 3.15 Zweifach-Hybridisierung einer 2₄-DNA-Halo

Die Aufnahme zeigt, dass sowohl die grün markierten SAR-E Elemente als auch die rot markierten IFNB1-Gene in der DNA-Halo und an der Kernmatrix lokalisiert sind

ein bis zwei bei insgesamt 12 Signalen), die Struktur der integrierten Transgene an sich ist jedoch wesentlich kompakter und stärker mit der Kernmatrix assoziiert.

Eine Bestätigung dafür, dass bei Multikopie-Integraten nicht alle S/MAR-Elemente als DNA-Anker genutzt werden, wurde auch bei einer Zweifach-Hybridisierung von 2₄-Zellen gegen das SAR-E Element (grün markierte Sonde) und die 6 kb entfernte kodierende Region des IFN-B1 Gens (rot markierte Sonde) gefunden. Beide DNA-Sequenzen sind sowohl an der Kernmatrix als auch in der Schleifenregion lokalisiert (Abb. 3.15, Heng et al. eingereicht). Wenn man die Schlaufengröße der einzelnen DNA-Schleifen ausmisst, die durch die Kernmatrix-assoziierten SAR-E Elemente gebildet werden, so fällt auf, dass sie viel mehr als 40 kb DNA umfassen. Das bedeutet, dass in einer DNA-Schleife mehrere Kopien des pCosIFNB-Cosmids enthalten sind. Für die Interaktion mit der Kernmatrix werden demnach nicht die benachbarten SAR-E Elemente herangezogen, sondern ein S/MAR-Elemente für mehrere Integrate eingesetzt. Allem Anschein nach werden die gebildeten DNA-Schleifen mit der Transgen-Kopienzahl immer größer. So ist auch die zunehmende Anzahl an SAR-E

Elementen in der DNA-Halo mit der pCosIFNB-Kopienzahl zu erklären. Besonders ausgeprägt ist dieser Zustand in 2₄-Zellen mit 100 integrierten pCos-IFNB-Domänen. Die Zunahme der Transgen-Kopien in der DNA-Halo ist erster Hinweis darauf, dass ein lokal begrenzter Zugang der Transgene und der flankierenden SAR-E Elemente zur Kernmatrix besteht.

Die Hybridisierungsexperimente zeigen, dass diejenigen IFNB1-Transgene einen Zugang zur nukleären Matrix haben, deren flankierende SAR-E Elemente mit der Kernmatrix assoziiert sind. Ob dieser Assoziationsstatus im transkriptionell aktiven Zustand erhalten bleibt, ist jedoch nicht klar. Grundsätzlich sind zwei Modellvorstellungen denkbar: (a) der Assoziationsstatus ändert sich mit Induktion der IFNB1-Transkription und eine erhöhte Anzahl an Genkopien bindet durch Umstrukturierungen an die Kernmatrix; (b) der Assoziationsstatus bleibt, unabhängig von der Transkription, konstant. Das Assoziationsverhalten der SAR-E Sequenzen könnte sich zum Beispiel durch DNA-Protein Interaktionen oder *chromatin remodelling* Prozesse nach der IFNB1-Induktion verändern. Andererseits wäre denkbar, dass nur die DNA-Bereiche transkriptionell aktiv sind, die einen Zugang zu Kernmatrix-Proteinen und damit zum Transkriptionsapparat der Zelle haben. Dementsprechend würde sich der Assoziationsstatus im Zellkern nicht verändern. Diese zweite Modellvorstellung wäre eine Möglichkeit, um das Abweichen der Transkriptionseffizienz von der integrierten Kopienzahl zu erklären (Abb. 3.12). Im folgenden wurde deshalb das Assoziationsverhalten der IFNB1-Kopien in Abhängigkeit von der Transkription untersucht. Für die Experimente wurden der bereits in Abbildung 3.14 gezeigte Klon K9 (12 Kopien) und 2₄-Zellen (100 Kopien) eingesetzt. Um einen Transgen-Integrationswert abzudecken, der zwischen 12 und 100 liegt, wurde der Klon K4 mit 35 pCosIFNB-Kopien (siehe auch roter Pfeil in Abb. 3.12) zusätzlich zu diesen beiden Zelllinien näher untersucht. Da der Klon K25 mit nur zwei Kopien eine konstante Kernmatrix-Assoziation auch ohne eine transkriptionelle Induktion zeigt, wurde auf die Hybridisierung dieser Zellen im folgenden verzichtet.

Zunächst wurde die Interferonproduktion mittels Sendai-Virus induziert (Details siehe Abschnitt 5.10.7). Anschließend wurde der Transkriptionsstatus 0h, 2h, 6h und 24h nach

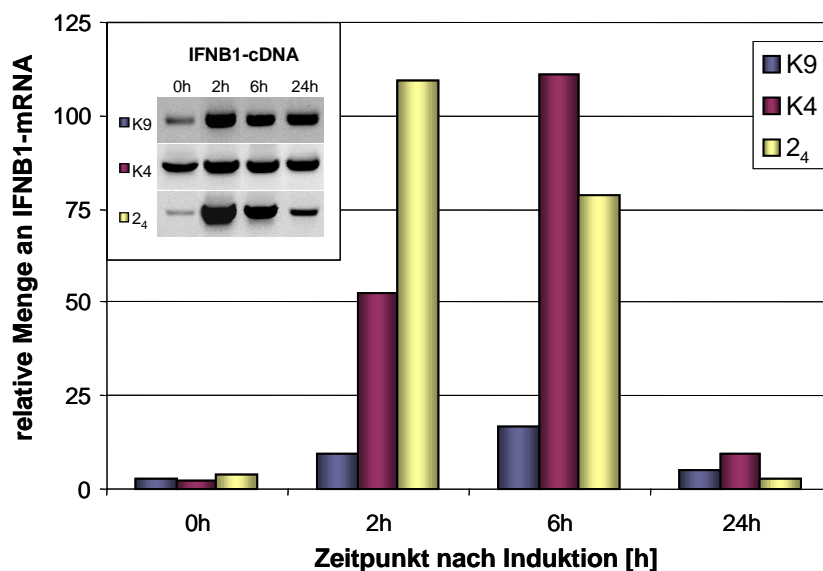


Abb. 3.16 IFNB1-mRNA Produktion in den Klonen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer viralen Induktion

Das Balkendiagramm verdeutlicht, dass bereits 2h nach einer Induktion große Mengen an IFNB1-mRNA von den Zellen produziert werden. Auch 6h nach Induktion ist die mRNA in den Zellen deutlich nachweisbar. Nach 24h ist die IFN-mRNA Menge bereits wieder auf den Ausgangslevel abgesunken. Bei der IFNB1-mRNA handelt es sich also um eine relativ kurzlebige RNA, die sehr schnell gebildet wird. Der Agarosegel-Ausschnitt im oberen Teil des Diagramms zeigt die spezifische IFNB1-cDNA Produktbildung nach erfolgreicher RT-PCR.

Induktion über die IFNB1-mRNA Bildung analysiert. Die gesamte RNA der induzierten Zellen wurde isoliert und mittels *Light Cycler Real Time* PCR die relative Menge an IFNB1-mRNA bestimmt. Ein Abgleich der mRNA-Konzentrationen untereinander erfolgte dabei über eine GAPDH-Standardkurve. Dazu wurde die GAPDH-cDNA Bildung bei unterschiedlichen RNA-Verdünnungen bestimmt und eine Regressionsgerade berechnet. Die GAPDH-cDNA Produktbildung bei maximaler RNA-Verdünnung wurde auf den Faktor eins gesetzt. Abbildung 3.16 zeigt den Transkriptionsstatus zu unterschiedlichen Zeitpunkten der IFNB1-mRNA Produktion. Man sieht, dass IFNB1

bereits zwei Stunden nach Induktion in signifikanten Mengen in den Zellen auftritt. Auch nach 6h sind noch große Mengen an IFNB1-mRNA nachweisbar. Bereits 24h nach Induktion ist ein Großteil der gebildeten mRNA wieder abgebaut. IFNB1-mRNA wird demzufolge schnell synthetisiert aber auch sofort wieder degradiert, was durch die Rolle von IFNB1 in der antiviralen Immunabwehr bedingt wird. Was aus Abbildung 3.16 außerdem hervorgeht, dass K4- und 2₄-Zellen in ihrem Maximum eine vergleichbare IFNB1-mRNA Produktion zeigen. Die IFNB1-Produktion der K9-Zellen ist deutlich geringer. Dieser Trend spiegelt sich auch wider, wenn man die IFNB1-Proteinproduktion der verschiedenen Zelllinien über einen Interferontest miteinander vergleicht. Die IFNB1-Proteinbildung ist in Klon K9 um 75% geringer als in den parallel untersuchten K4- oder 2₄-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Um die Transgenassoziation zur nukleären Matrix zu untersuchen, wurden - parallel zur RNA-Isolierung - DNA-Halos von den verschiedenen Klonen hergestellt. Die Halos wurden mit der kodierenden Region des IFNB1-Gens hybridisiert und die Kernmatrix-Bindung der einzelnen Gene an mindestens jeweils 50 Halos pro Hybridisierung ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen sind für die Klone K9 und K4 in Abbildung 3.17 exemplarisch dargestellt. Die kompakte Struktur der K9-Transgene ist gut zu erkennen. Diese Strukturierung bleibt während der IFNB1-mRNA Produktion unverändert. Für den Klon K4 mit 35 Kopien des Cosmids pCosIFNB ist eine deutlich diffusere Anordnung der Transgene zu erkennen. Ungefähr ein Viertel der IFNB1-Transgene ist in der DNA-Halo lokalisiert, die Struktur der Transgene ist weniger kompakt und Ausstülpungen sind gut erkennbar. Dieses Erscheinungsbild ändert sich nicht mit der Induktion der Transkription (Abb 3.17). Auch 2h und 6h nach der Induktion der IFNB1-Transkription ist ein konstanter Anteil der Transgenkopien in der DNA-Halo zu finden. Diese hätten demnach keinen Zugang zum Transkriptionsapparat der Zelle, der mit den Proteinen der Kernmatrix kolokalisiert (Lewis et al. 1984, Bode et al. 2000a). Von den 35

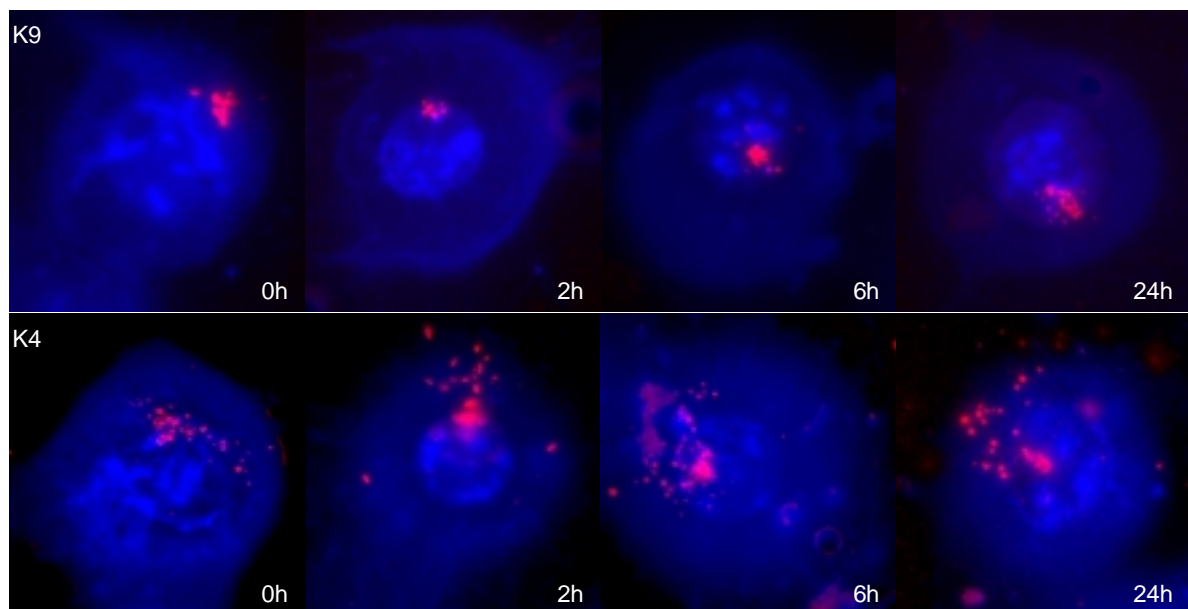


Abb. 3.17 Assoziationsstatus der IFNB1-Transgene zu verschiedenen Zeitpunkten der Transkription

Die Bildausschnitte zeigen typische Hybridisierungsmuster der Klone K9 und K4 zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer IFNB1-Induktion. In der oberen Reihe sind Halo-FISH Bilder des Klones K9 0h, 2h, 6h und 24h nach Induktion zu sehen. Es wird deutlich, dass ein Großteil der Signale mit der nukleären Matrix verankert ist. Dieser Assoziationsstatus ändert sich nicht mit der aktiven Transkription. Für Klon K4 konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. In dem Fall sind 25% der Transgenkopien konstant in den DNA-Schlaufen zu finden, der Rest der Kopien ist an die Kernmatrix gebunden.

integrierten Kopien sind ca. 25 an der nukleären Matrix zu finden, der Rest zeigt trotz flankierender S/MAR-Elemente keine Matrix-Assoziation. Somit konnte ein wichtiger Hinweis erbracht werden, warum viele stabil integrierte Transgenkopien nicht zu einer unbeschränkten Produktionssteigerung führen.

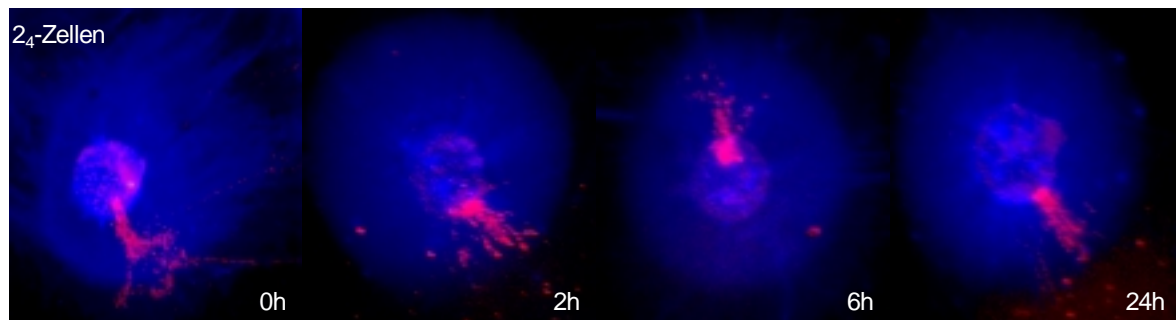


Abb. 3.18 Assoziationsstatus der IFNB1-Cosmide in 2₄-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Transkription

Die Aufnahmen repräsentieren die typische Organisation der integrierten IFNB1-Cosmide in 2₄-Zellen. Die Halo-FISH Bilder 0h, 2h, 6h und 24h nach Induktion zeigen, dass sich diese Organisation während der Transkription nicht signifikant verändert.

Auch in 2₄-Zellen sind nur ca. 25 IFNB1-Kopien an die Kernmatrix gebunden, d.h. in diesem Fall sind sogar 75% der Transgene in der DNA-Halo lokalisiert. Deren Assoziationsstatus ändert sich ebenfalls nach einer transkriptionellen Induktion nicht. Die Schlaufenbildung der integrierten Cosmide in 2₄-Zellen ist deutlich erkennbar, wenn gegen die gesamte 40 kb Domäne hybridisiert wird (Abb. 3.18). Die an

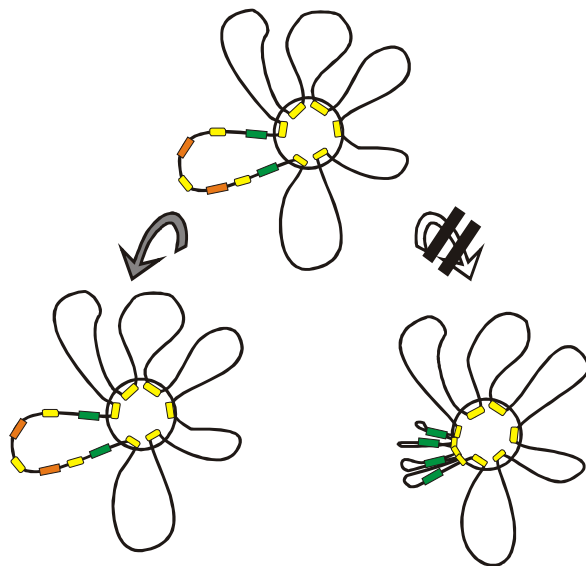


Abb. 3.19 Modell der S/MAR-Kernmatrix Interaktion

Die gelben Boxen stellen S/MAR-Elemente dar, die grünen Käste sind Symbole für aktive Gene. Rote Boxen stehen für inaktive Gene, die in der DNA-Halo nicht transkribiert werden können. Der rechte Seitenweg konnte aufgrund der Hybridisierungsergebnisse ausgeschlossen werden.

Die an die Kernmatrix gebundenen DNA-Bereiche sind auf einen Verankerungspunkt beschränkt, die restlichen Cosmid-Bereiche bilden ausgehend von diesem Punkt große Schlaufen. Diese Schlaufenbildung ändert sich nicht bei einer aktiven IFNB1-Transkription.

Die Ergebnisse der Hybridisierungsversuche beweisen, dass sich die relative Menge an aktiven S/MAR-Elementen in den analysierten Klonen nicht verändert. Es konnte ausgeschlossen werden, dass der Transkriptionsprozess den Zugang der integrierten, multiplen Genkopien zur Kernmatrix erhöht. Vielmehr trifft die Modellvorstellung der konstanten Anzahl an Assoziationspunkten zu (Abb. 3.19). Laut diesem Modell haben die Transgenkopien in den DNA-Schlaufen keinen Zugang zur Transkriptionsmaschinerie, was die Diskrepanz zwischen Kopienzahl und Transkriptionsaktivität erklärt. Somit konnte ein neuer Ansatz zur Erklärung von Transgenaktivität und -stabilität erbracht werden.

Die Anzahl der Assoziationspunkte mag zwar, relativ gesehen, konstant sein, ob immer die gleichen S/MAR-Elemente als DNA-Anker eingesetzt werden ist jedoch nicht klar. Vorstellbar wäre, dass S/MAR-Elemente, die in einer bestimmten DNA-Domäne lokalisiert sind, alternierend als DNA-Anker genutzt werden. Diese Vorstellung würde gut zu dem Modell einer mobilen Kernmatrix passen, die nicht starr im Zellkern verankert ist, sondern einen Teil des ICD-Kompartiments bildet (siehe Kapitel 2.1.1). Da genetisch identische S/MAR-Elemente, wie die hier als Ankersequenzen genutzten SAR-E Elemente, durch Hybridisierungsexperimente nicht voneinander unterschieden werden können, wurde im folgenden der gesamte humane IFN-Gencluster auf Chromosom 9 näher untersucht. Laut SIDD-Vorhersage und S/MAR-Bindungsversuchen sind in diesem Cluster ca. 100 starke S/MAR-Elemente lokalisiert. Verhält sich dieser natürliche Gencluster vergleichbar zu den künstlich erzeugten IFNB1-Domänen, müssten auch in diesem Fall große DNA-Schleifen vorhanden sein, da nicht alle S/MAR-Elemente gleichzeitig als Ankersequenzen genutzt werden könnten.

Als DNA-Sonden dienten in diesen Hybridisierungsexperimenten vier Bac-Klone, die jeweils 200 kb des humanen IFN-Genclusters abdecken und teilweise überlappen (Abb. 3.20). Die farbigen Balken symbolisieren den Fluoreszenzfarbstoff, mit dem die einzelnen Sonden markiert wurden. Hybridisiert wurde zum einen mit den Bac-Sonden 354P17 (rot) und 380P16 (grün), zum anderen mit den Sonden 1P8 (rot) und 113D19 (grün). Damit wurden entweder die DNA-Bereiche von IFNA1 bis IFNA2 oder von IFNWP18 bis IFNB1 abgedeckt.

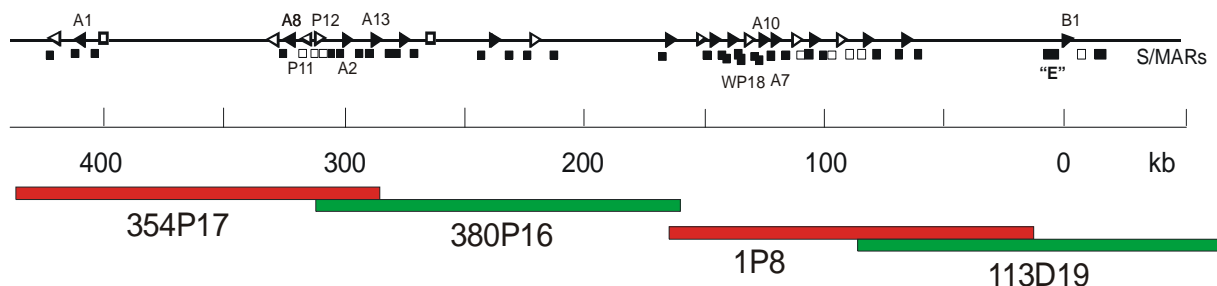


Abb. 3.20 Die Lokalisation der vier Bac-Sonden im IFN-Gencluster

Die Lage der verschiedenen Bac-Klone im IFN-Gencluster ist durch die farbigen Balken symbolisiert. Hybridisiert wurde entweder mit den Sonden 354P17 und 380P16 oder mit den Sonden 1P8 und 113D19.

Die Ergebnisse dieser Hybridisierungsexperimente in MG63-Zellen sind in Ausschnitten in Abbildung 3.21 dargestellt. Deutlich zu sehen sind die endogenen DNA-Schleifen, die die gesamte DNA-Halo durchziehen. Vergleicht man die Farbverteilung vor allem in den Bildausschnitten a und b, so ist zu erkennen, dass die Grünanteile an der Kernmatrix im Bildausschnitt b höher sind als im Ausschnitt a. Die Organisation der Schleifen ist also nicht konstant, sondern kann von Zelle zu Zelle variieren. Somit werden auch verschiedene DNA-Elemente als DNA-Anker benutzt. In Bildausschnitten c und d sind ebenfalls geringe Unterschiede in der Farbverteilung erkennbar, wobei in diesem Fall die Unterschiede nicht so deutlich sind, da die Schleifen in dem Bereich kompakter organisiert sind. Anscheinend werden in dieser DNA-Domäne relativ gesehen mehr S/MAR-Elemente als DNA-Anker genutzt. S/MAR-Elemente sind für die Bildung von DNA-Schleifenstrukturen essentiell. Fehlen solche Elemente, bilden sich unnatürlich große DNA-Ausstülpungen, wie durch Hybridisierungs-

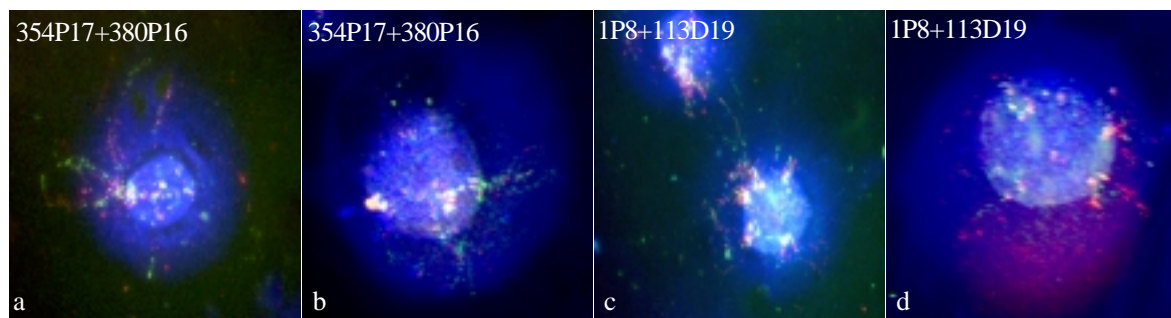


Abb. 3.21 Die endogene Schlaufenstruktur des humanen IFN-Genclusters in MG63-Zellen

Die Aufnahmen repräsentieren die typische Organisation des humanen IFN-Genclusters in MG63-Zellen. Diese Organisation ist nicht konstant, sondern kann von Zelle zu Zelle variieren (vgl. a und b). Die eingesetzten Bac-Sonden sind oben in den Bildausschnitten angemerkt.

354P17: rot; 380P16: grün; 1P8: rot; 113D19: grün

experimente mit mehrfach-integrierten Lambda-Sequenzen gezeigt werden konnte (Heng et al. eingereicht). Die DNA des Phagen besitzt keine S/MAR-Elemente, deshalb sind in diesem Fall die ersten möglichen Assoziationspunkte vom Integrationsort abhängig.

Die variable Organisation der DNA-Schlaufen konnte durch weitere Hybridisierungsexperimente bestätigt werden, insgesamt wurden um die 50 DNA-Halos in MG63-Zellen ausgewertet. Die in den Versuchen verwendeten Bac-Sonden wurden darüber hinaus in Hybridisierungsversuchen mit Lymphozyten eingesetzt. Auch in diesen Zellen konnte eine Variabilität in der Schlaufenstruktur bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Geht man davon aus, dass die oben beschriebenen Mehrfach-Kopie Zelllinien eine natürliche DNA-Domäne repräsentieren, ist ebenfalls anzunehmen, dass die integrierten SAR-E Sequenzen dynamisch mit der Kernmatrix assoziieren, also immer unterschiedliche Kopien an die Kernmatrix gebunden sind. Die Anzahl an genutzten S/MAR-Elementen ist für einen bestimmten Genlocus jedoch beschränkt.

In dieser Arbeit konnten erste Hinweise über die S/MAR-Dynamik in Zellen gesammelt werden. Nicht alle *in vitro* identifizierten S/MAR-Elemente des humanen IFN-Genclusters werden demnach in lebenden Zellen zur gleichen Zeit als DNA-Anker genutzt. Es wäre denkbar, dass vor allem moderate S/MAR-Elemente wie Terminatoren nur vorübergehend mit der Kernmatrix assoziieren. Durchaus logisch wäre die Hypothese, dass es S/MAR-Elemente gibt, die als konstitutive Assoziationssequenzen dienen, wohingegen andere nur nach Bindung bestimmter Proteinkomplexe, wie zum Beispiel die des Transkriptionsapparates, an die Kernmatrix binden. Diese Modellvorstellung würde gut zu den biologisch unterschiedlichen *in vitro* identifizierten S/MAR-Elementen passen (siehe Abschnitt 3.2).

3.5 Transgen-Integration in *scaffold attachment regions* abhängig vom Gentransfer: Retrovirale Infektion versus Elektroporation

3.5.1 Halo-FISH Analysen an stabil exprimierenden BHK-Transfektanten

Gentransfer-Mechanismen sind von fundamentalem Interesse in der Grundlagenforschung vor allem in Hinblick auf mögliche gentherapeutische Anwendungen (Scangos und Ruddle 1981). In Säugerzellen wird Fremd-DNA zumeist zufällig in bereits existierende

Strangbrüche integriert. Eine homologe Rekombination ist dagegen relativ ineffizient und um einen Faktor 100-10000 weniger häufig als die zufällige Integration (Bode et al. 2000b).

Unter den heutzutage üblichen Gentransfertechniken ist die retrovirale Integration aufgrund einer hohen und stabilen Expression von besonderem Interesse (Lipps et al. 2002). Im Falle der retroviralen Integration findet eine nicht-homologe Rekombination, vermittelt durch die retrovirale Integrase, statt (Shih et al. 1988). Was den Integrationsort betrifft, konnten vielfach flankierende DNase I hypersensitive Schnittstellen detektiert werden (Mielke et al. 1996). Diese Eigenschaft deutet auf strukturell und regulatorisch wichtige Elemente hin, auch wenn keine einheitliche Integrationssequenz identifiziert werden konnte (Wither-Ward et al. 1994). Die Verteilung der Integrationsorte wird trotzdem nicht völlig zufällig sein, da Fremd-DNA nicht überall den gleichen Zugang zum Säugergenom hat. Tatsächlich konnten Mielke et al. 1996 durch reverse PCR zeigen, dass eine retrovirale Integration vor allem an S/MAR-Elementen stattfindet. Die Wahl solcher Integrationsorte scheint logisch, wenn man bedenkt, dass es für Retroelemente nachteilig wäre, in inaktive Chromosomenloci zu integrieren (Scherdin 1990). Da üblicherweise auf die transfizierte Fremd-DNA durch Drogen ein Selektionsdruck ausgeübt wird, überleben nur die Klone mit einem bestimmten Transkriptionspotential. Dieses Transkriptionspotential kann über S/MAR-Elemente vermittelt werden, da eine Kernmatrix-Assoziation zu einer Erhöhung der Transkriptions-Initiationsrate führt (Schuebeler et al. 1996). Dieser Transkriptionsvorteil könnte der Grund dafür sein, dass S/MAR-Elemente generell als Integrationsorte bevorzugt werden, unabhängig von der Gentransfermethode. Dafür sprechen würde auch, dass DNA-Strangbrüche gehäuft in S/MAR-Elementen auftreten und so eine Integration von Fremd-DNA leicht erfolgen könnte (Bode et al. 2000b).

Deshalb wurden, unter Anleitung einer Diplomarbeit im Rahmen dieser Studie (Huesemann 2002), zwei Gruppen von stabil exprimierenden BHK-Klonen untersucht: (a) Klone, die durch retrovirale Infektion erzeugt wurden; (b) Klone, die über Elektroporation generiert wurden (Baer et al. 2000). Die stabilen BHK-Klone enthalten genau eine Kopie des retroviralen Expressionsplasmids pM5 β geo, so dass die gemessenen Transkriptionseffizienzen nicht von einer unterschiedlichen Kopienzahl, sondern allein vom Integrationsort abhängen. Das



Abb. 3.22 Das pM5 β geo Expressionsplasmid

Das retrovirale Expressionsplasmid besteht aus zwei LTRs, dem MPSV-Verpackungssignal (Ψ) und dem Fusionsgen LacZ-neo^R.

Expressionsplasmid pM5 β geo enthält die *long terminal repeats* (LTRs) und das Verpackungssignal des murinen *myeloproliferative sarkoma virus* (MPSV) (Abb. 3.22). Die retroviralen Gene sind durch das Reportergen β -Galacto-

sidase (LacZ) und den Neomycinphosphotransferase-Selektionsmarker (neo^R) ersetzt worden. Untersucht wurden jeweils 6 Klone, die durch Infektion und 6 Klone, die durch Elektroporation generiert wurden. Unter den untersuchten Klonen befinden sich für jede Population drei Hoch- und drei Niedrigexprimierer. Diese Auswahl wurde deshalb getroffen, weil eine mögliche Kernmatrix-Assoziation der Fremd-DNA nicht nur durch die Transfektionsmethode, sondern auch durch die Transkriptionseffizienz reflektiert werden kann. Möglicherweise zeigen Hochexprimierer generell eine stärker Bindung an die nukleäre Matrix als Niedrigexprimierer.

Die Expressionsprofile der einzelnen Klone sind in Abbildung 3.23 grafisch dargestellt. Die Transkriptionsaktivität der Klone wurde über einen β -Galaktosidase Reporterassay bestimmt. Die Abbildung zeigt die Klone angeordnet nach Expressionshöhen. Schwarze Balken symbolisieren die Infektanten, weiße die Transfektanten. Für die gesamte Gruppe der

Hochexprimierer ergibt sich nach drei voneinander unabhängigen Messungen eine durchschnittliche Expressionshöhe von $\sim 3 \times 10^5$ relativen Einheiten, für die Gruppe der Niedrigexprimierer eine von $\sim 1 \times 10^5$. Damit konnten die Werte, die von Baer et al. 2000 gemessen wurden, auch nach einer Langzeitlagerung der Klone bestätigt werden.

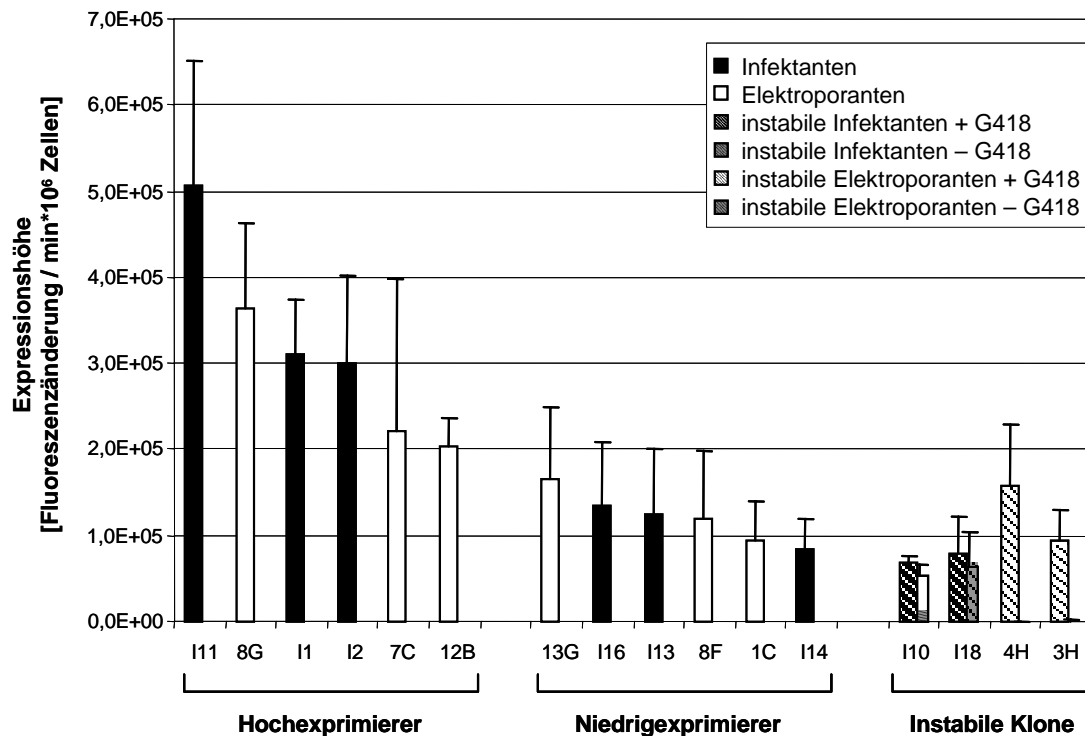


Abb. 3.23 Die Expressionsprofile der Infektanten und Elektroporanten

Die Expressionshöhe des β -Galaktosidase Reportergens wurde über Zellextrakte mittels MUG-Assay bestimmt. Gemessen wurde die Fluoreszenzänderung pro 10^6 Zellen in 5 min. In der Grafik sind die Klone nach Expressionshöhen in Hoch- und Niedrigexprimierer sortiert. Zusätzlich zu den stabil exprimierenden Klonen ist eine Gruppe von Klonen untersucht worden, deren Transgenexpression ohne Selektionsdruck abnimmt. Die instabilen Elektroporanten schalten komplett ab, wenn sie ohne G418 kultiviert werden, in Infektanten betrifft das *silencing* nur einzelne Zellen (siehe Abb. 3.28).

Zusätzlich zu den stabil exprimierenden BHK-Klonen wurde auch eine Gruppe von instabilen Klonen untersucht (gestreifte Balken), deren Expression ohne Kultivierung der Selektionsdroge G418 in einzelnen Zellen komplett abgeschaltet wird (grau gestreifte Balken in Abb. 3.23, siehe auch Abb. 3.28). Die Expressionshöhe der instabilen Klone ist im rechten Teil der Grafik in Abbildung 3.23 zu sehen. Auffällig ist, dass die instabil exprimierenden Klone durchweg zur Klasse der Niedrigexprimierer gehören. Das Abschalten der Genexpression, auch *gene silencing* genannt, tritt verstärkt bei den Elektroporanten auf, deren Expression ohne Zugabe von G418 sogar auf Null absinkt. Bei den Infektanten dagegen sind nur wenige Zellen vom *silencing* betroffen (siehe unten). Dieses unterschiedliche Verhalten der beiden Klongruppen bezüglich des *transgene silencing's* ist ein erster Hinweis darauf, dass die retrovirale Infektion das Provirus in einem genomisch günstigeren Kontext platziert als die Elektroporation.

Um die unterschiedlichen Klongruppen bezüglich ihrer *in situ* Kernmatrix-Assoziation zu untersuchen, wurde die oben dargestellte Methode der Halo-FISH Hybridisierung eingesetzt.

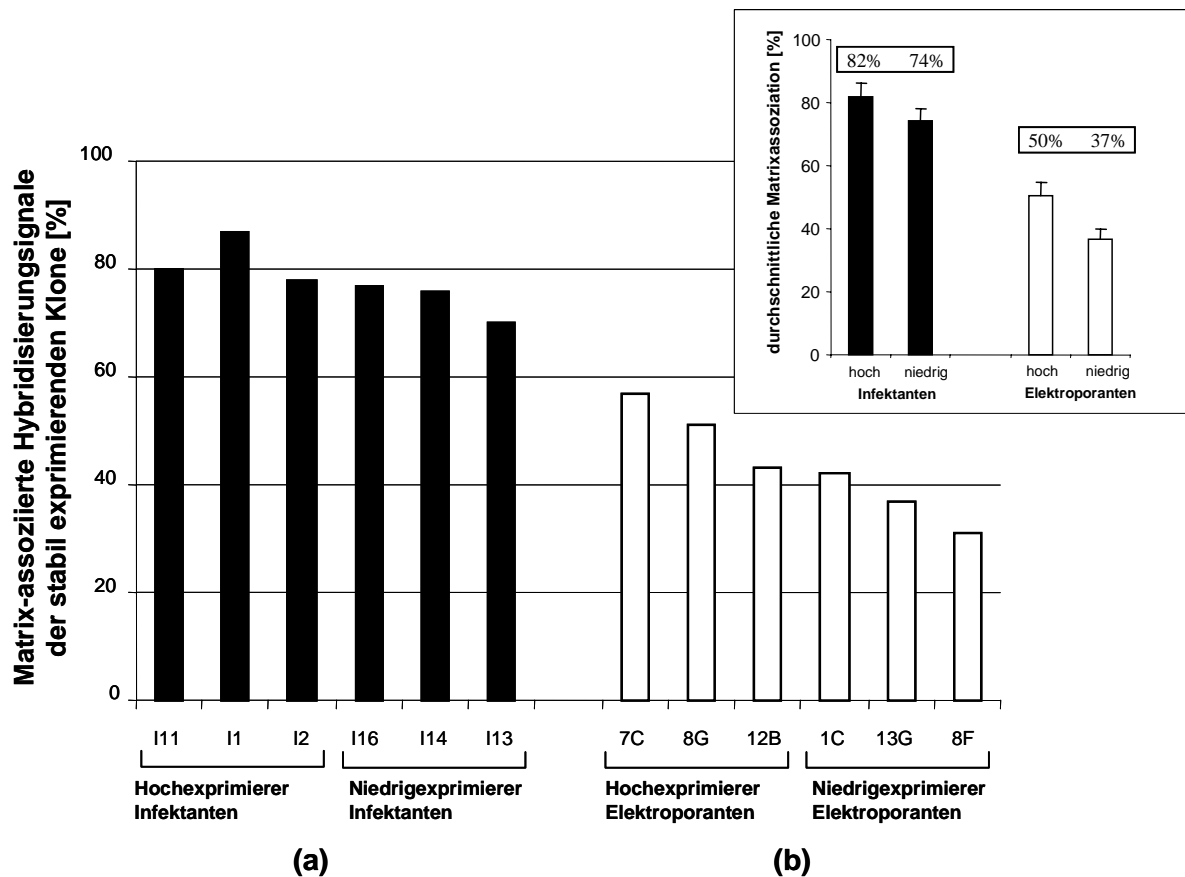


Abb. 3.24 Prozentuale Kernmatrix-Assoziation der stabil integrierten Proviren

Das Diagramm stellt die Matrix-Assoziationsfrequenz der Infektanten (schwarze Balken) bzw. Elektroporanten (weiße Balken) dar. Unterschieden wird außerdem zwischen Hoch- und Niedrigexprimierern. Die Grafik zeigt, dass die provirale DNA der Klone, die über retrovirale Infektion erzeugt wurden, eine hohe Affinität zur nukleären Matrix hat. Das gilt nicht für die Gruppe der Elektroporanten. Während es bei den Infektanten kaum Unterschiede zwischen Hoch- und Niedrigexprimierern gibt, unterscheiden sich diese Populationen bei den Elektroporanten durchschnittlich um 15%. Die gemittelte Kernmatrix-Assoziation der verschiedenen Populationen ist im rechten Ausschnitt der Abbildung zu sehen.

Die über eine Hochsalzlösung extrahierten Zellkerne wurden mit einer Digoxigenin-markierten pM5 β geo-Sonde hybridisiert. Da es sich bei der zu detektierenden Fremd-DNA um integrierte Einzelkopien handelte, wurde die Signalintensität über eine alkalische Phosphatase vermittelte Farbreaktion verstärkt (rote Signale, siehe 5.12.3.2). Um eine statistisch abgesicherte Aussage machen zu können, wurden von jedem untersuchtem Klon ungefähr 50 hybridisierte DNA-Halos aus unterschiedlichen Präparationen mikroskopisch ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungsversuche sind in Abbildung 3.24 grafisch zusammengefasst. Im linken Teil der Grafik sind die Infektanten, unterteilt in Hoch- und Niedrigexprimierer, im rechten Teil die Elektroporanten dargestellt. Zwischen den einzelnen Transfektionsgruppen sind deutliche Unterschiede erkennbar. Klar wird, dass alle Infektanten, unabhängig von der Expressionshöhe, eine starke Assoziation zur Kernmatrix zeigen. In der Gruppe der untersuchten Hochexprimierer sind 82% der integrierten Proviren an die Kernmatrix gebunden, in der Gruppe der Niedrigexprimierer beträgt die durchschnittliche Assoziationsfrequenz 74% (siehe Ausschnitt in Abbildung 3.24). Damit sind die beiden Expressionsgruppen kaum voneinander zu

unterscheiden. Die geringen Unterschiede in der Kernmatrix-Assoziation, die maximal in einem Bereich von 10% liegen, können durch die Charakteristik des individuellen Integrationsortes bedingt sein: Hochexprimierer werden bei der retroviralen Integration wahrscheinlich stärkere S/MAR-Elemente getroffen haben. Fest steht, dass auch nach der Integration über retrovirale Infektion der S/MAR-Charakter des Integrationsortes in der Zelle erhalten bleibt. Da es sich bei der S/MAR-Kernmatrix Assoziation um ein dynamisches System handelt, binden die Transgene nicht zu 100% an die Kernmatrix (s.o. und Heng et al. eingereicht). Die Integration in Regionen mit stärkerem S/MAR-Charakter bedeutet lediglich, dass sich insgesamt die Frequenz erhöht, mit der eine bestimmte DNA-Sequenz an der nukleären Matrix zu finden ist. Erstaunlich ist dennoch, dass nach der Integration von 7,6 kb Fremd-DNA die Bindungskapazität des Integrationsortes erhalten bleibt, da die oben beschriebenen *in vitro* Versuche gezeigt haben, dass nicht-S/MAR-DNA die Bindungsstärke von S/MAR-Elementen nachhaltig beeinflussen kann (siehe Abb. 3.1). Die über die retrovirale Infektion getroffenen Integrationsorte müssen demnach einen starken S/MAR-Charakter aufweisen.

Ein auffallend anderes Verteilungsmuster ergibt sich, wenn man die Gruppe der Elektroporanten näher betrachtet, die im rechten Teil der Abbildung 3.24 zusammengefasst ist. Im Vergleich zu den Infektanten zeigen die Elektroporanten eine deutlich niedrigere Affinität zur nukleären Matrix. Für die Gruppe der Hochexprimierer ergibt sich eine durchschnittliche Matrix-Bindungsaffinität von 50%, für die der Niedrigexprimierer nur eine von 37%. Ein Großteil der integrierten Proviren ist also nicht Matrix-assoziiert, sondern in der DNA-Halo lokalisiert. Bei den Elektroporanten ergibt sich eine maximale Bindungsaffinität zur Kernmatrix für den Klon 7C von 57%, eine minimale Assoziation von 31% wurde für Klon 8F beobachtet. Die Unterschiede zwischen Hoch- und Niedrigexprimieren bei Elektroporanten sind viel

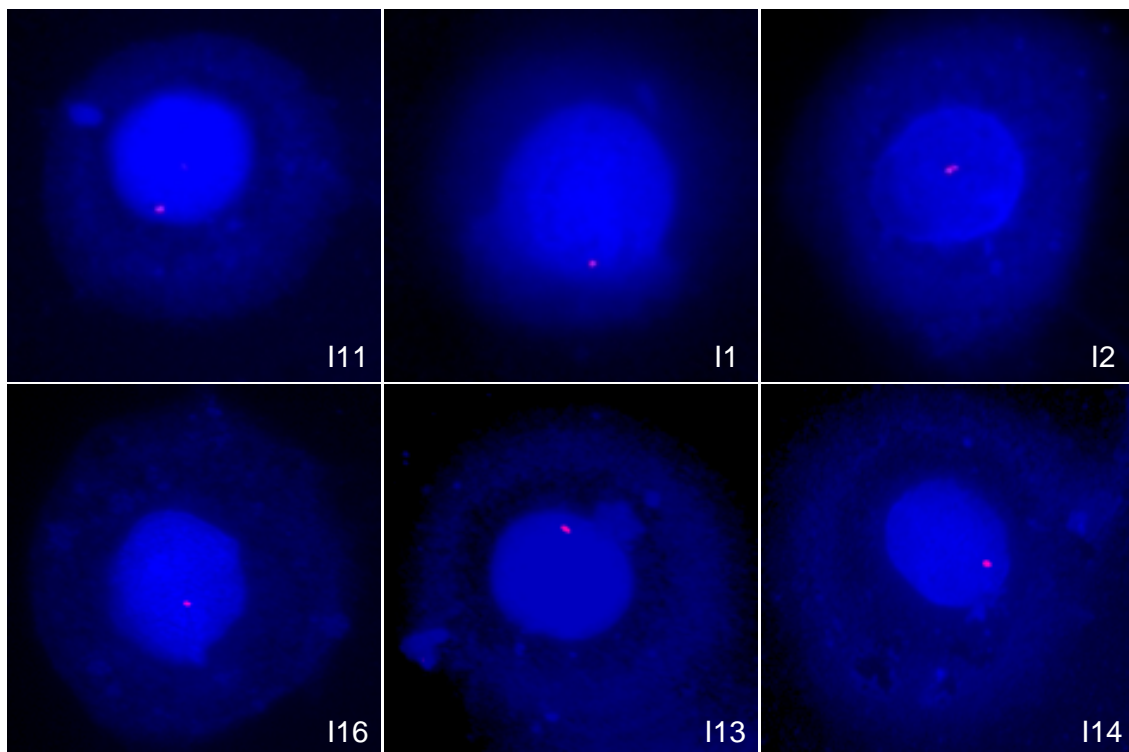


Abb. 3.25 Typische Halo-FISH Aufnahmen der Infektanten

Die Aufnahmen zeigen, dass bei Infektanten die provirale DNA vorwiegend an der Kernmatrix zu finden ist (rotes Signal). In der oberen Reihe sind die Hochexprimierer, in der unteren die Niedrigexprimierer zusammengefasst.

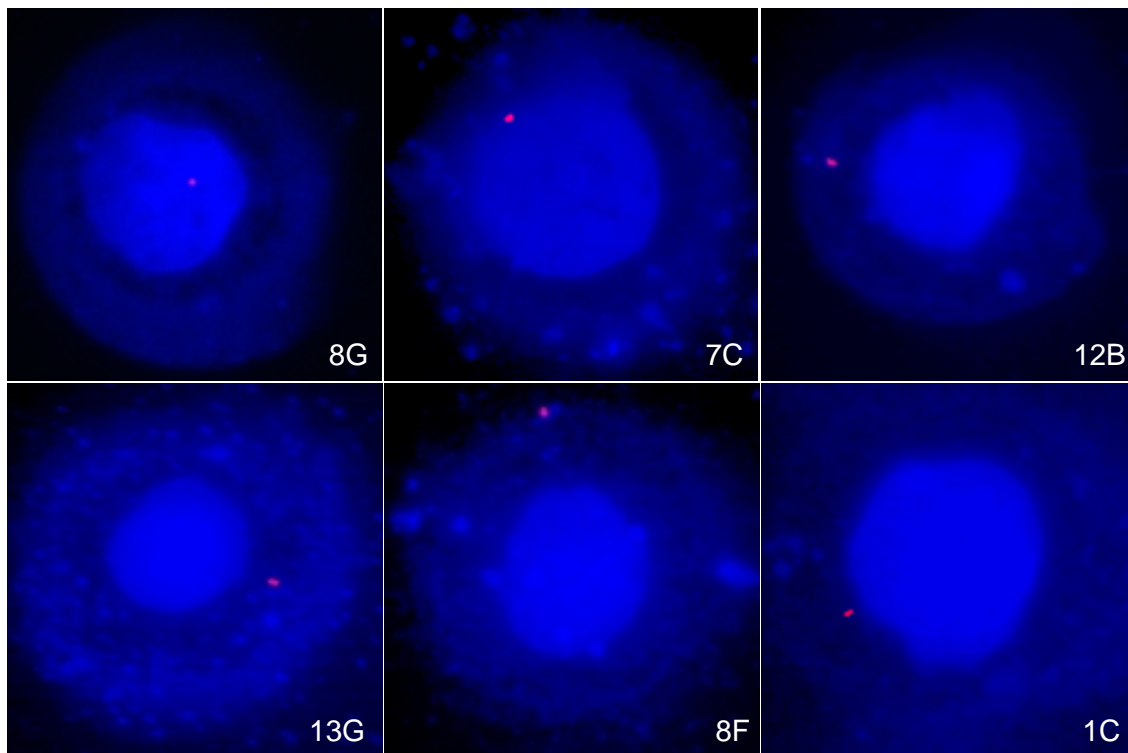


Abb. 3.26 Typische Halo-FISH Aufnahmen der Elektroporanten

Die Aufnahmen zeigen, dass bei Elektroporanten die provirale DNA vorwiegend in der DNA-Halo zu finden ist (rotes Signal). Das gilt vor allem für die Klongruppe der Niedrigexprimierer, die in der unteren Reihe dargestellt ist. Die Hochexprimierer sind in der oberen Reihe zusammengefasst.

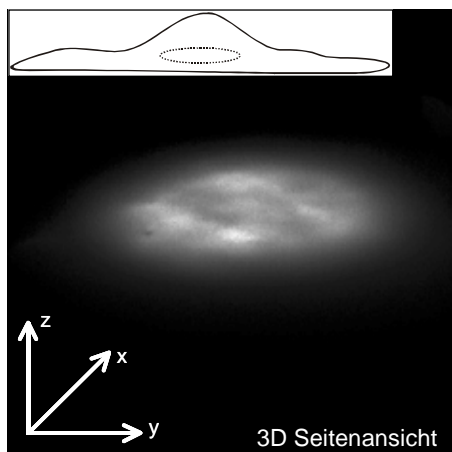


Abb. 3.27 Gekippte Seitenansicht einer 3D DNA-Halo

Das Bild besteht aus einer Überlagerung von 15 Aufnahmen mit einem Abstand von $0,1 \mu\text{m}$ in Z-Richtung. Deutlich wird die dreidimensionale Ausdehnung der DNA-Halo, wobei die Ausdehnung in Z-Richtung jedoch relativ gering ist. Die Skizze im oberen Teil der Abbildung stellt die 3D DNA-Halo modellhaft dar.

deutlicher als bei den Infektanten. Bei den Elektroporanten reflektiert anscheinend der Assoziationsstatus die transkriptionelle Aktivität. Für eine aktive Transkription müssen die Gene aus der DNA-Halo an die Kernmatrix wandern. Dementsprechend finden sich die Transgene der Klongruppe der Hochexprimierer häufiger an der Kernmatrix als die der Gruppe der Niedrigexprimierer. Exemplarische Aufnahmen sowohl der Infektanten als auch der Elektroporanten sind in den Abbildungen 3.25 und Abbildung 3.26 zusammengefasst.

Zieht man in Betracht, dass mikroskopisch nur eine Aufsicht der Präparate ausgewertet wird, erniedrigt sich die Assoziationswahrscheinlichkeit vor allem für die Elektroporanten weiter. Wenn die Flächeninhalte für die Kernmatrix und die umgebende DNA-Halo ausgemessen und zueinander in Beziehung gesetzt werden, stellt man fest, dass $\sim 30\%$ der Gesamtfläche vom Kerngerüst eingenommen werden. Signale, die innerhalb dieses Bereiches liegen, werden möglicherweise als an die Kernmatrix gebunden gewertet, obwohl sie nur in den DNA-Schleifen direkt über der Kernmatrix liegen (siehe

Abb. 3.27). Dieser über der Kernmatrix liegende DNA-Bereich ist jedoch wegen der dünnen Schichtdicke mikroskopisch nicht hinreichend auflösbar, so dass auch über Techniken wie der konfokalen Mikroskopie Signale, die an die Kernmatrix gebunden sind, nicht von darüber liegenden Signalen in der DNA-Halo unterschieden werden können. Da aber die DNA-Halo direkt über der Kernmatrix aufgrund der Präparationsmethode relativ flach ist und damit wenig DNA umfasst, spielt dieser Fehler vor allem bei der Assoziationsfrequenz der Infektanten nur eine untergeordnete Rolle.

Die endgültige Schlussfolgerung, die aus den oben erläuterten Versuchen gezogen werden kann, ist, dass der Gentransferweg entscheidend für den Integrationsort von Fremd-DNA im Genom ist. Die Expressionsstärke spielt dabei eine untergeordnete Rolle und spiegelt sich eher indirekt in der Kernmatrixassoziation wider. Die retrovirale Infektion stellt demnach einen Integrationsmechanismus dar, der gezielt DNA-Bereiche attackiert, die Einzelstrangbildungspotential besitzen. Damit ergibt sich eine Gentransfermethode, die neben der homologen Rekombination eine gezielte Integration in eine bestimmte Art von DNA-Strukturen ermöglicht.

3.5.2 Halo-FISH Analysen an instabil exprimierenden BHK-Transfektanten

Das Abschalten der Genexpression - das sogenannte *gene silencing* - ist eine der am besten studierten epigenetischen Modifikationen der DNA. Verursacht wird das *gene silencing* häufig durch eine Histon-Methylierung vor allem im Promotorbereich von Genen, welche mit einer Histon-Deacetylierung einhergeht (Wolffe und Matzke 1999). Ein Signal für das Abschalten der Genexpression kann zum Beispiel *antisense* mRNA sein, wie sie bei der Integration von retroviraler DNA in das Wirtsgenom auftritt (Matzke et al. 1999). Ein *gene silencing* kann auch durch Wiederholungen in der DNA-Sequenz oder durch Translokationen im Genom ausgelöst werden (Wolffe und Matzke 1999, Nakamura et al. 1999).

In dieser Arbeit wurden vier Einzelkopieklone des retroviralen Expressionsplasmids pM5 β geo untersucht, deren Transgenexpression nach einigen Monaten Kultivierung ohne die Selektionsdroge G418 teilweise abgeschaltet ist (Baer et al. 2000). *Southern Blot* Analysen dieser Klone zeigten, dass das Transgen in den Zellen immer noch intakt ist. Misst man die β -Galaktosidase Produktion der instabilen Klone I10, I18, 3H und 4H über die Herstellung von Zellextrakten und anschließender Fluoreszenzmessung im *ELISA-Reader* (MUG-Assay, siehe 5.11.1.2), so stellt man fest, dass die Transgenexpression bei den Elektroporanten völlig abgeschaltet wurde (Abb. 3.23). Bei den Infektanten I10 und I18 sind nur geringe Unterschiede zwischen den Populationen messbar, die mit bzw. ohne G418 kultiviert wurden. Um zu zeigen, dass die Unterschiede in der Expressionshöhe auf ein komplettes *gene silencing* in einzelnen Zellen zurückzuführen sind und nicht auf eine generelle Expressionserniedrigung in allen Zellen, wurde die β -Galaktosidase Expression auf Einzelzellbasis überprüft. Dabei wurde das Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl - β -D-Galaktosid) im Cytoplasma der zuvor fixierten Zellen über β -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Als Positivkontrolle dienten Zellen des Infektanten I11, die zu 100% blau gefärbt waren, als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte Zellen eingesetzt. Ausschnitte der X-Gal Zellfärbung und deren Auswertung sind in Abbildung 3.28 grafisch dargestellt. Während bei einer Kultivierung mit G418 ein Großteil aller Zellen eine aktive Transgenexpression zeigt - wie man es bei einem Fusionsprotein aus Reportergen und Resistenzmarker erwartet - finden sich bei den Zellen, die ohne Selektionsdroge kultiviert wurden, deutliche Expressionsunterschiede abhängig vom Gentransferweg. Bei

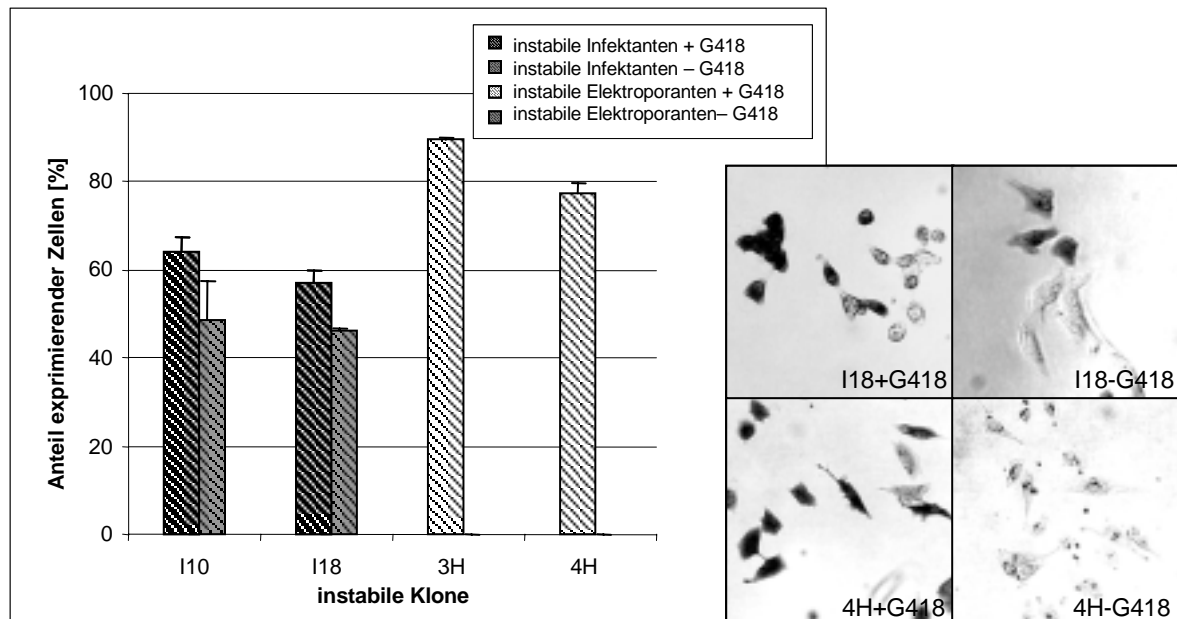


Abb. 3.28 X-Gal (blau/weiß) Einzelzellfärbung der instabil exprimierenden Klone

Die Grafik zeigt den prozentualen Anteil blau gefärbter und damit β -Galaktosidase produzierender Zellen. Die grau gestreiften Balken stehen für die Zellpopulationen, die ohne G418 kultiviert wurden. Auffällig ist, dass die Elektroporanten kein Enzym mehr produzieren, wenn sie ohne Selektionsdroge gehalten werden. Ausschnitte der blau/weiß-Färbung sind für die Klone I18 und H4 exemplarisch im rechten Teil der Abbildung angefügt.

den Elektroporanten konnte ein Abschalten des β -Galaktosidasegens in allen Zellen beobachtet werden, die Infektanten dagegen zeigen immer noch eine Genexpression in ca. 50% der Zellen. Ein Abschalten der Transgenexpression tritt nicht in allen Zellen gleichzeitig auf, sondern ist ein stochastischer Prozess, der nach und nach passiert und bei den Infektanten anscheinend nicht so ausgeprägt ist (Baer et al. 2000).

Die instabil exprimierenden Klone wurden anschließend über Halo-FISH Analysen untersucht (Abb. 3.29). Dabei zeigten sich weitere Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen. Was den Infektanten I10 betrifft, so konnte keine veränderte Assoziationsfrequenz aufgrund des *gene silencing*'s festgestellt werden, wie im Balkendiagramm in Abbildung 3.29 zu sehen ist. Über das Kriterium der Kernmatrix-Assoziation unterscheidet sich der Klon I10 also nicht von den stabil exprimierenden Infektanten. Betrachtet man dagegen die Kernmatrix-Assoziation des Klons I18, dann fällt auf, dass die Assoziationsfrequenz - sowohl für Zellen die mit als auch für Zellen die ohne G418 kultiviert wurden - im Vergleich zu den stabilen Infektanten um 10%-20% reduziert ist (vgl. Abb. 3.24). Das Abschalten der DNA-Domäne führt also in diesem Fall dazu, dass das Transgen eine niedrigere Affinität zur nukleären Matrix hat. Solch eine veränderte Affinität scheint aber nicht generell mit einem *gene silencing* einherzugehen, sondern von dem individuellen Klon und damit vom Integrationsort abzuhängen (vgl. Klone I10 und I18). Auffällig ist, dass im Fall der instabilen Infektanten die Genexpression auch in Zellen abgeschaltet wird, die unter Selektionsbedingungen kultiviert werden (Abb. 3.28). Eine Erklärung dafür wäre, dass in diesen Zellen die Expression des Transgens lediglich vermindert ist, nicht aber komplett abgeschaltet wurde. Von dem Fusionsprotein aus β -Galaktosidase und Neomycinphosphotransferase würde demnach so viel produziert, dass die

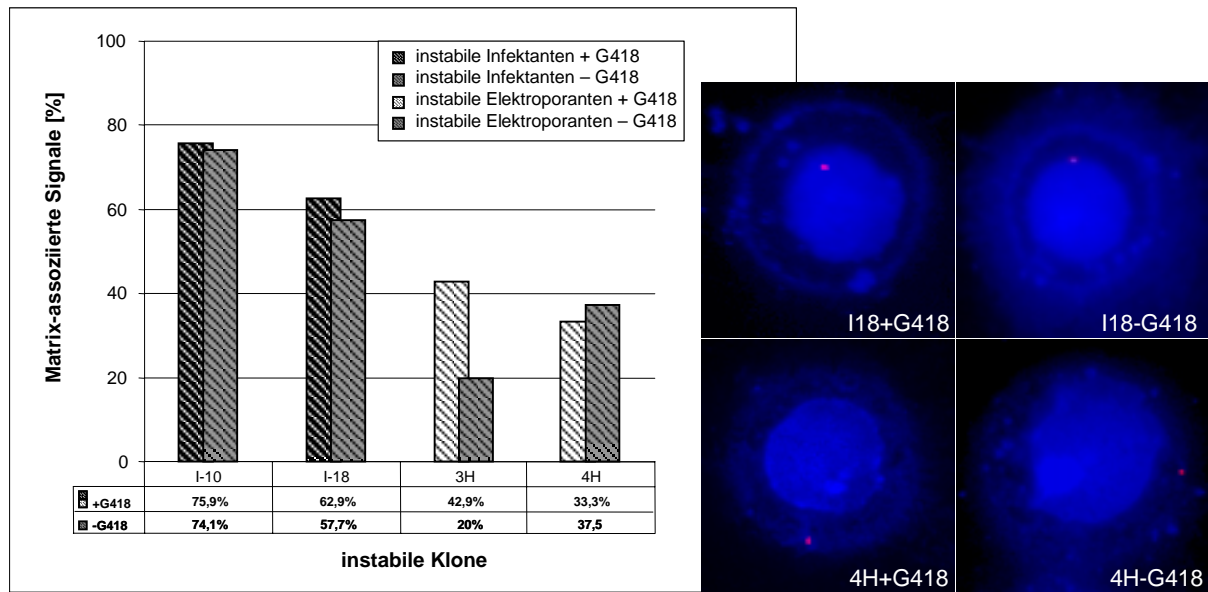


Abb. 3.29 Kernmatrix-Bindungsverhalten der instabil exprimierenden Klone

Im linken Teil der Abbildung ist die statistische Auswertung der Hybridisierungsexperimente in einem Balkendiagramm zusammengefasst. Je Klon wurden etwa 50 DNA-Halos ausgewertet. Zur Verdeutlichung sind die Kernmatrix-Assoziationswerte unter dem Diagramm tabellarisch dargestellt. Im rechten Teil der Abbildung sind exemplarische Aufnahmen der Klone I18 und H4, jeweils mit und ohne G418 kultiviert, zu sehen.

Zellen resistent wären und unter Zugabe von G418 wachsen könnten, die Proteinproduktion wäre aber über eine Einzelzellanfärbung nicht detektierbar. Der geringe Expressionslevel des Fusionsproteins in einigen Zellen der instabil exprimierenden Infektanten spricht für einen ungünstigen und instabilen Integrationsort.

Die instabilen Elektroporanten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, gehören - was ihren Expressionslevel betrifft - ebenfalls zur Gruppe der Niedrigexprimierer. Ihr Assoziationsverhalten unterscheidet sich dementsprechend nicht signifikant von dem der Niedrigexprimierer. Lediglich für den Elektroporanten 3H konnte eine Erniedrigung der Transgen-Kernmatrix Assoziation um 20% festgestellt werden. Auch hier scheint das *gene silencing* also nicht zwingend mit einem veränderten Assoziationsverhalten einherzugehen. Allerdings muss festgestellt werden, dass bei den niedrig exprimierenden Elektroporanten die DNA-Kernmatrix Interaktion ohnehin gering ist, so dass Unterschiede auf diesem Niveau sehr schwer auszumachen sind.

Alles in allem sind die in diesem Abschnitt gezeigten Experimente sowohl der stabilen als auch der instabilen Transfektanten ein erster Weg, die Transgenintegration *in situ* näher zu charakterisieren, was im Zuge einer zuverlässigen Gentherapie immer wichtiger wird. Die gängige Annahme, dass eine Fremd-DNA Integration außerhalb von kodierenden Regionen tolerierbar ist, ist so nicht haltbar. Auch nicht-kodierende Sequenzen wie zum Beispiel S/MAR-Elemente sind essentiell für eine zuverlässige und geregelte Genexpression.

4. Diskussion & Ausblick

Traditionell wurden S/MAR-Elemente über eine Reihe von klassischen Ansätzen identifiziert, die alle eine Extraktion von löslichen Kernproteinen und die Präparation einer sogenannten nukleären Matrix beinhalten. Die Auswahl der getesteten DNA-Fragmente und der eingesetzten DNA-Sonden erfolgte dabei eher zufällig, d.h. ohne eine vorherige Analyse des Einzelstrangbildungspotentials. Dies führte dazu, dass in der Vergangenheit S/MAR-Elemente oft nicht richtig identifiziert und lokalisiert wurden, was ihre Klassifikation und funktionelle Analyse erschwerte. Aufgabe dieser Doktorarbeit war deshalb, die Interaktionen zwischen DNA und Kernmatrix-proteinen unter Berücksichtigung biomathematischer Vorhersagealgorithmen zu untersuchen. Dazu wurden unterschiedliche biomathematische Ansätze über weite DNA-Bereiche, extensive S/MAR-Bindungsstudien sowie die neu entwickelte Methode der *in situ* FISH-Analyse eingesetzt.

4.1 Potentielle Funktionen von S/MAR-Elementen im Bereich der DNA-Organisation und -Regulation

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Interaktionen zwischen *scaffold attachment regions* und der Kernmatrix spezifiziert werden. Dazu wurden destabilisierte DNA-Bereiche im Interferon-Gencluster untersucht. Zum einen wurden genassoziierte Sequenzen wie Terminatoren oder das SAR-E Element, zum anderen intergenische Elemente mit einem hohen Strangtrennungspotential in S/MAR-Bindungsexperimenten analysiert.

4.1.1 Genassoziierte S/MAR-Elemente

Über S/MAR-Bindungsversuche konnte nachgewiesen werden, dass funktionelle Gene von destabilisierten DNA-Bereichen flankiert sind, die alle ein Kernmatrix-Assoziationspotential besitzen (siehe Abb. 3.2 und 3.3). Besonders stark ist dieses Potential im 3'-Terminatorbereich der Gene, der Promotor ist dagegen nur schwach destabilisiert. Die kodierende Region selbst zeigt keine Tendenz, Einzelstränge auszubilden. Ähnliche Destabilisierungsprofile wie die der IFN-Gene sind von C. Benham 1996 für verschiedene Gene der Hefe publiziert worden. Auch PolI-transkribierte rDNA Gene von Organismen wie *Drosophila* oder der Maus zeigen ein vergleichbares SIDD-Profil (Benham 1996). Das spezifische Destabilisierungsmuster, vom Promotor über das Gen bis hin zum Terminator, scheint also sequenzunabhängig über verschiedene Organismen hoch konserviert zu sein. Eine mögliche Erklärung für dieses konservierte Organisationsmuster ist der Einfluss des Polymerase-Transkriptionskomplexes auf die DNA. Bindet dieser Komplex an sein Substrat und transkribiert die DNA in 5'-3'-Richtung, erzeugt das Voranschreiten der Transkription eine positive Superhelizität vor und eine negative Superhelizität hinter dem Molekülkomplex (Liu und Wang 1987). Eine Ansammlung positiver Superhelizität vor dem Transkriptionskomplex kann ein Voranschreiten der Transkription stark behindern. Eine destabilisierte 3'-Terminatorregion kann die entstandene Spannung auffangen und so zu einem schnellen Voranschreiten des Polymerase-Transkriptionskomplexes und damit zu einer effektiven Transkription beitragen. Gleichzeitig isoliert ein destabilisierter Terminator das Gen von seinen 3'-gelegenen Nachbarn, indem er eine Ausbreitung der positiven Superhelizität in umliegende DNA-Bereiche verhindert. Solch ein

Isolatoreffekt garantiert eine effektive Termination der Transkription. Die durch die Transkription entstandene negative Superhelizität im 5'-Bereich des Transkriptionsapparates hat wiederum einen Effekt auf die Promotorregion der Gene. Die negative Superhelizität kann zu einer Aufwindung der destabilisierten Promotor-Sequenzen führen und so eine erneute Transkriptionsinitiation erleichtern. Das Vorhandensein eines SIDD-Potentials in der kodierenden Region selbst würde ein Voranschreiten der Transkription stark behindern, da ein *unwinding* dort zur Bildung von Sekundärstrukturen führen könnte. Ein Destabilisierungspotential in diesem Bereich schließt sich somit aus.

Dass stark destabilisierte Sequenzen notwendig für eine effektive Transkriptionstermination sind, wurde auch durch Experimente von Zaret und Sherman 1982 bestätigt. Deletiert wurde dort eine 38 bp große Region im Terminatorbereich des Hefe CYC-Gens. Betrachtet man diese Mutante in SIDD-Profilen, so fällt auf, dass die gesamte Genregion ihre Stabilität verliert, da die Destabilisierung vom Terminator nicht mehr aufgefangen wird (Benham 1996). Experimentelle Befunde zeigen, dass die Terminationseffizienz für den 3'-Bereich auf ca. 10% absinkt (Zaret und Sherman 1982). Eine schlechte Transkriptionstermination kann dazu führen, dass die Genexpression signifikant abnimmt. Ein Grund dafür ist, dass die RNA-Polymerase weiter in die umliegenden DNA-Bereiche transkribiert und es zu einer transkriptionellen Abschaltung der Genexpression kommen kann (Greger und Proudfoot 1998, Mette et al. 1999). Ein starkes Destabilisierungspotential des Terminators verhindert demnach ein *gene silencing*.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eindeutig bewiesen werden, dass in Eukaryonten ein hohes SIDD-Destabilisierungspotential auch ein hohes Kernmatrix-Bindungspotential reflektiert. S/MAR-Bindungsversuche in der gesamten Region des Interferon-Genclusters haben diese Assoziation bestätigt. Dass sowohl Promotor- als auch Terminatorbereiche einen S/MAR-Charakter aufweisen, lässt sich auch durch die Zusammensetzung der Kernmatrix begründen. Damit ein Gen exprimiert wird, müssen sowohl die RNA-Polymerase als auch andere Transkriptionsfaktoren einen Zugang zur DNA haben. Diese Komponenten der Transkriptionsmaschinerie sind in Eukaryonten im Interchromatin-Kompartiment bzw. an der Kernmatrix lokalisiert (Lewis et al. 1984, Bode et al. 2000a). Transkriptionell aktive Gene müssen dementsprechend einen Zugang zur Kernmatrix haben (Gasser und Laemmli 1986), was am besten über flankierende S/MAR-Elemente erreicht wird. Dabei müssen diese S/MARs keineswegs konstitutiv mit der Kernmatrix assoziiert sein. Ihre Assoziation kann mit einer Aktivierung der Genexpression einhergehen. Dass S/MARs als Terminatoren fungieren können, wurde auch über Versuche mit dem episomalen Vektor pEPI-1 gezeigt. Der Vektor enthält neben dem SV40 *origin of replication* und dem GFP-Gen auch das starke S/MAR-Element SAR-E. Das S/MAR-Element sorgt dafür, dass der Vektor auch ohne die Expression des viralen T-Antigens über viele Passagen stabil als Episom erhalten bleibt (Baiker et al. 2000). Aus klonierungstechnischen Gründen ist die Terminatorsequenz des GFP-Gens bei der Herstellung des pEPI-1 Plasmids verloren gegangen. Trotzdem findet eine Transkription des GFP-Gens statt. Die daraus resultierende mRNA ist um ca. 700-800 bp größer als die native GFP-mRNA. Die Transkription endet demnach 700-800 bp im SAR-E Element. Tatsächlich konnten zwei aataaa-Motive in diesem S/MAR-Element gefunden werden, die in dem Fall des fehlenden GFP-Terminators anscheinend als PolyA-Site fungieren (K. Nehlsen, mündliche Mitteilung). Das SAR-E Element übernimmt hier also effizient die Funktion des natürlichen GFP-Terminators.

Anders sieht das Erscheinungsbild bei den Pseudogenen aus. Die hier untersuchten Pseudogene des Interferon-Genclusters besitzen zum Großteil keine destabilisierten flankierenden DNA-Elemente (siehe Abb. 3.4). Das schwach destabilisierte 3'-terminale Fragment des

IFNWP18-Pseudogens hat so gut wie keine S/MAR-Bindungsaktivität im Gegensatz zu den Terminatorfragmenten funktioneller Gene (Abb. 3.4 und Tab. 3.1). Allem Anschein nach ist ein destabilisierter Terminator Voraussetzung für eine aktive Gen-Transkription. Ob das Destabilisierungspotential bei den Pseudogenen im Laufe der Evolution verloren gegangen ist oder ob sie aufgrund fehlender Destabilisierungseigenschaften niemals funktionell waren, kann im Nachhinein nicht eindeutig beantwortet werden. Aufschlussreich ist aber, bezüglich dieser Fragestellung die Pseudogene IFNP11 und IFNP12 näher zu betrachten. Der Interferon-Gencluster ist in zwei große Transkriptionseinheiten unterteilt. Alle Interferon-Gene, die distal vom Pseudogen IFNP11 liegen, werden in Richtung des Telomers transkribiert (siehe auch Pfeile in Abbildung 2.5). Diese Transkriptionsrichtung ändert sich zwischen den Pseudogenen IFNP11 und IFNP12. Hier liegt ein Inversionspunkt des IFN-Genclusters, so dass alle Gene ab dem Interferon IFNP12 entgegengesetzt in Richtung des Centromers transkribiert werden. Wahrscheinlich ist das invertierte Centromer-gelegene Fragment im Laufe der Evolution aufgrund einer Duplikation und anschließenden Inversion des distalen Fragments entstanden (Diaz et al. 1994, Diaz 1995). Wenn das der Fall ist, dann wäre das Pseudogen IFNP11 das Homolog des Pseudogens IFNP12. Betrachtet man jetzt die SIDD-Profile der Pseudogene, so sieht man, dass das Pseudogen IFNP11 noch einen Teil an Destabilisierungspotential besitzt, sein Homolog IFNP12 jedoch nicht (Abb. 3.4). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass IFNP11 aufgrund einer höheren Mutationsrate an Einzelstrangbildungspotential verloren hat. Die erhöhte Mutationsrate des invertierten DNA-Bereiches wird auch deutlich, wenn man den Bereich proximal des IFNA8-Gens betrachtet: ab hier nimmt die Homologie zwischen den beiden duplizierten Fragmenten stark ab, wahrscheinlich wegen weiterer Deletions- und Duplikationsereignisse (Diaz et al. 1994). Alles in allem lässt sich aus diesen Daten schlussfolgern, dass flankierende Elemente der IFN-Pseudogene vormals Destabilisierungspotential besessen haben, dieses Potential aber aufgrund eines fehlenden Selektionsdrucks im Laufe der Evolution teilweise verlorengegangen ist.

Das Fehlen flankierender destabilisierter DNA-Elemente ermöglicht somit, funktionelle Gene von Pseudogenen zu unterscheiden. Gerade im Hinblick auf die Auswertung der DNA-Informationen, die sich im Laufe der Sequenzierung des Humangenoms angesammelt haben, bietet das Destabilisierungsprofil Möglichkeiten in der Definition funktioneller DNA-Bereiche. Es existieren unterschiedliche Ansätze, um kodierende Sequenzen im Genom vorherzusagen. Die meisten Vorhersagemodelle basieren dabei auf der Primärsequenz, wie zum Beispiel das Programm *PromoterInspektor* von Genomatix, welches nach typischen Promotor- und Enhancerelementen sucht (Scherf et al. 2000). Dieser Ansatz ermöglicht nicht, funktionelle Gene von Pseudogenen zu unterscheiden, was zu falschen Annahmen in der Genvorhersage führen kann. Zieht man zu solchen Primär-Sequenzanalysen Destabilisierungseigenschaften hinzu, eröffnet sich die Möglichkeit, Genvorhersagen zu präzisieren und zu vervollständigen. Somit kann ein *screening* nach neuen, nicht charakterisierten Genen gezielter durchgeführt werden.

4.1.2 Intergenische S/MAR-Elemente

Neben den genassoziierten destabilisierten Elementen sind in dieser Arbeit auch Bereiche aus einer intergenischen Region des Interferon-Genclusters getestet worden. Die intergenischen Sequenzen mit Einzelstrangbildungspotential werden durch schmale ausgeprägte Peaks beschrieben und zeigen durchweg eine starke Bindung an die nukleäre Matrix (Abb. 3.5). Die intergenischen Peaks treten mit einer Periodizität von $n \times 3000$ bp auf, was in der Größenordnung von 15-20 Nukleosomen liegt. Das unterschiedliche Bindungsverhalten der interge-

nischen Peaks im Vergleich zu den genassoziierten S/MAR-Elementen wird bei aus dem Vergleich der Bindungskurven nach Adair deutlich (Abb. 3.6). Obwohl das Fragment T-B1 und das intergenische Fragment F20 ein vergleichbares Destabilisierungspotential besitzen, reflektieren die Bindungskurven ein voneinander abweichendes Bindungsverhalten. Die Wettbewerbsversuche mit dem SAR-E Element zeigen, dass intergenische S/MARs auch bei Absättigung der Standard S/MAR-Bindungsplätze an die nukleäre Matrix binden können (Abb. 3.6a). Intergenische S/MARs haben demnach andere Bindungspartner an der Kernmatrix. Damit konnte zum erstenmal gezeigt werden, dass es definitiv unterschiedliche Gruppen von S/MAR-Elementen gibt, die sich in ihren Bindungseigenschaften voneinander unterscheiden.

Die DNA der Eukaryonten ist hierarchisch in mehrere Organisationsstufen unterteilt (Abb. 2.2). Eine der ersten Organisationsstufen ist dabei die Verpackung der DNA mit Histonen zu Nukleosomen. Kürzliche gemachte Beobachtungen haben gezeigt, dass es - zusätzlich zu sequenzspezifischen Eigenschaften und der Bindung von Proteinen wie Transkriptionsfaktoren an die DNA - weitere Signale gibt, um Nukleosomen entlang der DNA anzuordnen. So haben Kiyama und Trifonov 2002 beobachtet, dass DNA Beugungen (*bends*) im Durchschnitt alle vier Nukleosomen auftreten. Diese periodisch auftretenden *bends* spielen nicht nur eine Rolle bei der Anordnung der Nukleosomen, sondern auch bei der Faltung des Chromatins. Die Periodizität der *bends* kann durch regulatorische Sequenzen oder Gene unterbrochen werden und ist in ihrer hierarchischen Funktion niedriger einzuordnen als die Genexpression. Im Rahmen der Anordnung der Nukleosomen könnten die in dieser Arbeit identifizierten intergenischen S/MARs eine weitere, höhere Organisationsstufe des Chromatins darstellen. Die SIDD-Minima können in dem Fall als Positionierungssignal im Abstand von 15-20 Nukleosomen fungieren, wie von Bode et al. 2000b dargestellt. Diese DNA-Organisationsstufen werden nur in den Regionen des Genoms dominant, in denen keine klassischen regulatorischen Elemente wie zum Beispiel Enhancer liegen.

Der rein organisatorischen Funktion der intergenischen S/MARs widersprechen die Expressionsversuche, die in Abbildung 3.8 exemplarisch dargestellt sind. Die stabile Integration eines S/MAR-Luciferase Reporterkonstrukts in entweder NIH 3T3 Zellen oder BHK-A Zellen zeigt, dass die intergenischen S/MAR-Elemente einen deutlichen Transkriptionseffekt bewirken. Dieser Effekt ist, was seine Stärke betrifft, mit dem Effekt des starken SAR-E Elements vergleichbar. Das transkriptionsfördernde Verhalten der intergenischen S/MARs ist umso signifikanter, als dass es sich bei den destabilisierten Regionen um kurze, nur ca. 300 bp große DNA-Sequenzen handelt. Wenn die hier identifizierten intergenischen S/MARs nur organisatorische Elemente darstellten, wäre der gemessene Transkriptionseffekt mit einer rein strukturellen Funktion in der Organisation des Chromatins schwer zu erklären. Möglicherweise sind solch organisatorische Signale aus vormaligen regulatorischen Elementen im Laufe der Evolution entstanden, und ihre regulatorische Funktion ist aufgrund einer konservierten Kernmatrix-Anheftung erhalten geblieben. Eine andere Hypothese dagegen, um die Funktion der starken intergenischen S/MARs im Genom unabhängig von der DNA-Organisation zu erklären, ist die Assoziation dieser Elemente mit einer *locus control region* (LCR) im Bereich des Interferon-Genclusters. *Locus control regions* werden für die Ausbildung einer „offenen“ DNase I-sensitiven Chromatin-Domäne vor der transkriptionellen Aktivierung benötigt (Forrester et al. 1987). In transgenen Mäusen sind LCRs funktionell definiert worden über ihre Wirkung, entwicklungsabhängig die Expression eines gekoppelten Transgens - unabhängig vom Integrationsort - zu vermitteln (Grosveld et al. 1987). LCRs sind bisher für eine Reihe von Gendomänen gefunden worden. Beispiele sind unter anderem der humane CD2 Locus (Festenstein et al. 1996) und die Lysozym Gendomäne beim Huhn (Bonifer et al. 1994). Die

„Prototyp“ *locus control region* ist im 5'-Bereich des humanen β -Globin-Genclusters identifiziert worden. Der β -Globin-LCR wird unbedingt für eine stabile Genexpression benötigt, er sorgt für eine veränderte und damit „offene“ Chromatin-Struktur über eine mehr als 150 kb große DNA-Region (Dillon und Grosveld 1993). Die 20 kb große *locus control region* beinhaltet eine Ansammlung von fünf DNase I hypersensitiven Sites (DNase I HS). Jede dieser Sites ist ungefähr 200-300 bp groß und besitzt eine hohe Dichte an Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen. Die Gesamtheit der DNase I HS reguliert wesentlich die Transkription der Gene des Clusters (Forrester et al. 1986 und 1990). So besitzt zum Beispiel die HS2 des LCR's eine Enhancerfunktion (Grosveld et al. 1987, Fraser et al. 1993). Gleichzeitig können die DNase I HS als Isolatorsequenzen gegen die Einflüsse des umliegenden Chromatins wirken, wie von Chung et al. für die HS4 des β -Globin-LCR's des Huhns gezeigt (Chung et al. 1993). Basierend auf den hier dargestellten Befunden besteht eine *locus control region* also aus Enhancerelementen, welche mit zusätzlichen „Hilfssequenzen“ kombiniert sind. Solche „Hilfssequenzen“ sind häufig S/MAR-Elemente. Dass S/MARs mit Enhancern assoziiert sein können, ist schon seit vielen Jahren bekannt und unter dem Begriff *cohabitation phenomenon* beschrieben worden (Gasser und Laemmli 1986). So enthält unter anderem der murine Immunglobulin μ schwere Kette Genlocus ein intragenisches Enhancerelement, welches als LCR fungieren kann (Jenuwein und Grosschedl 1991). Dieser Immunglobulin μ Enhancer wird an beiden Seiten von S/MAR-Elementen flankiert (Cockerill et al. 1987).

Betrachtet man die hier dargestellten wissenschaftlichen Erkenntnisse, könnte es sich bei der ausgedehnten, intergenischen Region mit destabilisierten Sequenzen um eine *locus control region* des IFN-Genclusters handeln: die destabilisierten intergenischen Elemente besitzen sowohl ein starkes Kernmatrix-Bindungspotential als auch eine starke *augmentation*-Funktion bei einer stabilen Transgenintegration. Eine konstitutive Interaktion des LCR's mit den Kernmatrixproteinen wird benötigt, um die Domäne „offen“ zu halten, über einen transkriptionsfördernden Effekt können benachbarte Gene aktiviert werden (Forrester et al. 1999, Fernandez et al. 2001). Die intergenischen S/MARs stellen, laut MAR-Finder Analyse, die stärksten Assoziationspunkte und damit wahrscheinlich konstitutiven Interaktionspartner der DNA mit der Kernmatrix für den gesamten IFN-Gencluster dar (Abb. 3.7). Bisher ist noch keine *locus control region* für den 400 kb großen Interferon-Gencluster identifiziert worden. Es ist nicht klar, ob die IFNA-Gene unabhängig vom IFNB1-Gen reguliert werden oder ob ein alles umfassender LCR existiert. Die IFNA-Gene werden zwar vorwiegend in Monozyten und Makrophagen transkribiert, wohingegen IFNB1 in Fibroblasten produziert wird, die virale Immunantwort beinhaltet jedoch in einigen Fällen eine Aktivierung beider Gengruppen (Marie et al. 1998, Siegal et al. 1999). Diese Koaktivierung spricht für die Existenz eines einzigen LCRs, der gut zwischen den beiden Gengruppen lokalisiert sein kann, um so eine Auswirkung auf die unterschiedlichen Subcluster haben zu können. Auch dieses „Lokalisationskriterium“ trifft für die intergenischen S/MAR-Elemente zu. Die Interaktion der einzelnen Subcluster mit der *locus control region* ist über das sogenannte *looping model* zu erklären (Bode et al. 1996). Das *looping model* geht davon aus, dass zum Beispiel eine Interaktion von Enhancern und Promotoren über ein *looping out* der dazwischen liegenden Sequenzen stattfindet. Solch eine DNA-Modulation kann über die Bindung von S/MAR-Elementen an die Kernmatrix vermittelt werden. Der starke S/MAR-Charakter der intergenischen Sequenzen bietet, dem *looping model* zufolge, eine Plattform, mit der die Interferon-Gene durch bestimmte DNA-Schleifen Konstellationen kommunizieren können.

4.1.3 Die unterschiedlichen Ebenen der DNA-Kernmatrix Interaktion

Die in Abbildung 3.6a dargestellten Wettbewerbsversuche haben gezeigt, dass die intergenischen und die genassoziierten S/MARs unterschiedliche Bindungspartner an der Kernmatrix haben. Eine Erklärung für das unterschiedliche Bindungsverhalten der S/MAR-Elemente liefert die Zusammensetzung der nukleären Matrix. Die Kernmatrix besteht aus einer Vielzahl von Komponenten, Hauptbestandteile sind die nukleären Lamine und die hnRNP-Proteine. Lamine bilden nicht nur die Lamina, sondern sind auch am Aufbau eines intranukleären Netzwerkes beteiligt (Goldman et al. 2002). Die wichtigsten Domänen der Lamin-Proteine sind in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt. Die ersten Lamine, die mit DNA-Kernmatrix Interaktionen in Verbindung gebracht wurden, waren die B-Typ Lamine (Ludérus et al. 1992).

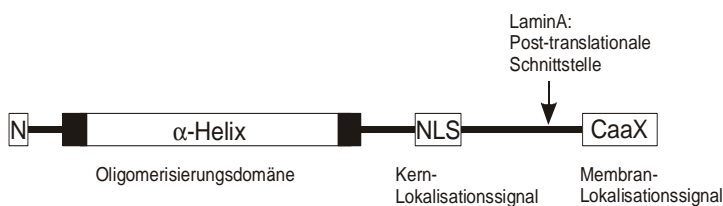


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Lamin-Proteine

Die Grafik fasst einige der wichtigsten Merkmale der Lamin-Proteine zusammen. Eingezeichnet ist unter anderem die α -Helix Domäne, die die Dimerisierung und anschließende Polymerisierung der Proteine vermittelt. Weiterhin sind die *nuclear localisation signal* (NLS) Sequenz sowie die CaaX-Box markiert. Über Post-translationale Modifikationen dieser CaaX-Box kann eine Bindung an die Kernmembran vermittelt werden.

Die Bindungskapazität der B-Lamine hängt dabei vom Polymerisierungsstatus des Proteins ab, was auch als *mass-binding* Phänomen bezeichnet wird (vgl. SAF-A). Ist die α -Helix Domäne des Proteins polymerisiert, können DNA-Sequenzen an die Lamine binden, was im nicht-polymerisierten Zustand nicht möglich ist (Zhao et al. 1996). Die gebildeten Oligomere müssen dabei größer als Dimere sein. Ein ähnliches DNA-Bindungsverhalten ist für A- und C-Typ Lamine gefunden worden (Stuurman et al. 1998). Ein weiteres DNA-Bindungsmotiv konnte sowohl

für LaminA als auch für LaminB im Bereich der NLS-Sequenz lokalisiert werden. Dieses Proteinsegment bindet DNA nur über Histone. Sowohl A- als auch B-Typ Lamine binden *in vitro* an S/MAR-Elemente. Wettbewerbsstudien haben gezeigt, dass es dabei für Lamine zwei Arten von DNA-Interaktionen gibt: Lamine binden über die kleine Furche sowohl an doppelsträngige DNA-Moleküle als auch an einzelsträngige DNA-Bereiche (Ludérus et al. 1994). Diese beiden DNA-Bindungen sind dabei gegeneinander kompetierbar.

Die Laminzusammensetzung ist nicht in jeder Zelle gleich. Grundsätzlich findet man bei Vertebraten in allen Zellen eine konstante Menge an LaminB₂, wohingegen LaminB₁ nur während der frühen Embryonalentwicklung exprimiert wird (Clarke 1992). Die Expression von LaminB₁ korreliert dabei mit einer starken Zellproliferation. A-Typ Lamine dagegen werden nur während oder nach einer Differenzierung exprimiert und korrelieren mit einer Proliferations-Inhibition (Stuurman et al. 1998). Mit einer unterschiedlichen Zusammensetzung des nukleären Laminnetzes kann sich dementsprechend auch das Assoziationsverhalten von spezifischen S/MAR-Elementen ändern. So ließe sich zum Beispiel die differenzierungsspezifische Assoziation des Keratin-Gens in differenzierten *Xenopus*-Keratinocyten erklären (Vassetzky et al. 2000). Schließlich interagieren sowohl Lamine A als auch Lamine B mit einer Reihe von Proteinen wie den LAP-Proteinen, Emerin, BAF und anderen (Cohen et al. 2001). Viele dieser Proteine wiederum können ebenfalls mit Chromatin interagieren und dementsprechend mit S/MAR-Elementen. Einer unterschiedlichen Erkennung und Spezifikation von S/MAR-Elementen scheinen damit keine Grenzen gesetzt.

Eine weitere Hauptkomponente der Kernmatrix bilden hnRNP Proteine wie der *scaffold attachment factor* SAF-A, der auch unter dem Namen SP120 (Tsutsui 1998) oder hnRNP-U bekannt ist (Göhring und Fackelmayer 1997). *In vivo crosslinking* Versuche haben gezeigt, dass dieser Faktor neben RNA auch an DNA binden kann. Die Primärstruktur des Proteins verdeutlicht seine duale Rolle in der Zellkernorganisation: (a) eine C-terminale RGG-Box vermittelt die Bindung von RNA und Einzelstrang-DNA, (b) eine N-terminale 45 Aminosäuren große SAF-Box vermittelt die Bindung an S/MAR-Elemente. Die Bindung von einzel- und doppelsträngiger DNA wird in diesem Fall über unterschiedliche Proteinmotive bewirkt und ist nicht gegeneinander kompetierbar. Die SAF-Box ist zwischen den Spezies hoch konserviert und vermittelt als Einzelkomponente nur eine schwache S/MAR-Bindung. Das SAF-A Protein hat aber eine starke Tendenz zu polymerisieren und bindet als Multimer S/MAR-Elemente über einen Prozess, der als *mass-binding* bezeichnet wird, wodurch sich die positive Kooperativität des Bindungsprozesses erklärt (vgl. Lamine). Positive Kooperativität bedeutet, dass SAF-A Proteine eine erhöhte Polymerisationsbereitschaft zeigen, wenn sie an S/MAR-Elemente gebunden sind und so mehrere SAF-Boxen eine starke DNA-Protein Interaktion vermitteln (Kipp et al. 2000). Die S/MAR-Bindung ist optimal, wenn sogenannte *AT-Patches* in bestimmten Abständen in der DNA angeordnet sind (Tsutsui 1998). Die S/MAR-SAF-A Interaktion wird über die kleine Furche der DNA vermittelt. Vergleicht man qualitativ und quantitativ die Bindung von S/MAR-Elementen an über Sephadex-Säulen immobilisierte SAF-Boxen mit der DNA-Bindung an eine isolierte Kernmatrix, lässt das den Schluss zu, dass ein Großteil der DNA-Kernmatrix Interaktionen über SAF-Proteine vermittelt wird. Dass SAF-Proteine essentiell für eine geordnete Zellkernstruktur sind, sieht man auch am Beispiel einer N-terminalen SAF-A Mutante, der die SAF-Box fehlt. Transfiziert man die deletierten Proteine transient in COS7-Zellen, kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Zellproliferation (Kipp et al. 2000). SAF-Proteine, neben SAF-A auch das Protein SAF-B, sind also wesentlich an der Bindung von S/MAR-Elementen beteiligt.

Die Proteinzusammensetzung der Kernmatrix ist teilweise vom Zell- oder Gewebetyp abhängig. Bei Zelltyp-spezifischen Bestandteilen der Kernmatrix handelt es sich, neben bestimmten Laminen, insbesondere um Proteine wie Transkriptionsfaktoren, die für eine regulierte Genexpression verantwortlich sind. Ein prominentes Zelltyp-spezifisches S/MAR-bindendes Protein ist SATB1. SATB1 wird vorwiegend in Thymocyten exprimiert und ist ursprünglich als Protein beschrieben worden, das mit der Transkription eines S/MAR-Reporterkonstrukts interferiert (Kohwi-Shigematsu et al. 1997). Es bindet über die kleine Furche ausschließlich an doppelsträngige DNA, wobei es zwischen Regionen mit BUR-Potential und stabilen Regionen unterscheidet. SATB1 besitzt eine S/MAR-bindende Domäne und eine Homeodomäne, die beide mit ATC-Sequenzmotiven in BUR-Regionen interagieren. In SATB1^{-/-} Thymocyten verändert sich das Assoziationsverhalten SAT-B1 bindender DNA-Elemente: die normalerweise an der Kernmatrix lokalisierten SATB1 bindenden DNA-Fragmente verlieren ihren Kontakt zur Kernmatrix (de Belle et al. 1998). In Halo-FISH Analysen sind diese DNA-Sequenzen anstatt an der Kernmatrix in der DNA-Halo lokalisiert. T-Zellen in SATB1 *knock-out* Mäusen arretierten in einer doppelt positiven (CD4⁺CD8⁺) Phase, was innerhalb von 3 Wochen zu einer Letalität führt (Yasui et al. 2002). Zur Zeit wird davon ausgegangen, dass die Wirkung von SATB1 davon abhängt, mit welchen Transkriptions- oder *Silencing*-Komplexen das Protein interagiert. SATB1 definiert damit eine Klasse von Transkriptionsregulatoren, die als „Andockplattform“ für eine Reihe von Chromatin *Remodelling* Enzymen fungieren können und damit Chromatin-Domänen regulieren.

Die hier angeführten Protein-Komponenten der Kernmatrix deuten darauf hin, dass die

Bindung von DNA an die nukleäre Matrix über verschiedene Ebenen läuft. SAT-B1 erkennt zum Beispiel ATC-Sequenzmotive, wohingegen SAF-A *AT-Patches* erkennt. Durch Lamine werden einzelsträngige DNA-Bereiche, aber auch doppelsträngige DNA gebunden. Über solch unterschiedliche Bindungsmoden lassen sich auch die diversen biologischen Funktionen erklären, die mit S/MAR-Elementen assoziiert sind. Es ist bekannt, dass nicht alle S/MARs die gleichen biologischen Aktivitäten vermitteln. S/MARs können zum Beispiel eine DNA-Domäne gegen Positions-Effekt Variationen abschirmen, eine stabile Expression gewährleisten oder *augmentation*-Eigenschaften besitzen (Bode et al. 2000a). Basierend auf diesen unterschiedlichen Funktionalitäten wurde von Paul und Ferl 1998 ein Modell für das Pflanzengenom vorgeschlagen, welches davon ausgeht, dass relativ große Schleifen durch konstitutiv bindende S/MAR-Elemente -sogenannte *loop basement attachment regions* (LBARs) - gebildet werden. Andere S/MAR-Elemente, die innerhalb dieser Schleife lokalisiert sind, können unterschiedliche regulatorische Funktionen haben und sind nur in speziellen Fällen wie einer aktiven Transkription an die Kernmatrix gebunden (vgl. auch *pulling model* in Abb. 4.4). Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen legen nahe, dass dieses Modell auch auf andere Organismen zutrifft. Zur Gruppe der variabel und damit nicht-konstitutiv bindenden S/MAR-Elemente gehören demzufolge die Promotor- und Terminator-S/MARs. Diese S/MARs besitzen höchstens eine moderate Affinität zur nukleären Matrix und konkurrieren mit wesentlich stärkeren S/MAR-Elementen wie dem SAR-E um ein und denselben Protein-Interaktionspartner. Eine Interaktion mit der Kernmatrix ist für Promotor- und Terminator-Fragmente nur während der Transkription notwendig, deshalb muss eine konstitutive Bindung nicht vorliegen. Kandidaten für die Gruppe der konstitutiv bindenden S/MAR-Elemente und damit für die LBARs sind die in dieser Arbeit charakterisierten, stark bindenden, intergenischen DNA-Fragmente. Da sie im Gegensatz zu den sogenannten Standard-S/MARs nicht in der direkten Umgebung von Genen lokalisiert sind, können die intergenischen Sequenzen gut die transkriptionsunabhängige konstante Basis der DNA-Schleifen bilden. Auf die Dynamik der DNA-Schleifenorganisation wird in Abschnitt 4.3 weiter eingegangen.

4.1.4 Spezifikation von S/MAR-Elementen: ein Ausblick

Vor allem was die intergenischen S/MAR-Elemente betrifft, fällt die Einordnung in einen biologischen Kontext schwer, da solche Elemente bislang noch nicht in größerem Umfang identifiziert und analysiert wurden. Für die Zukunft ist deshalb zum einen eine Erweiterung der S/MAR-Kartierungsexperimente nötig, zum anderen müssen die jeweiligen Protein-Bindungspartner an der Kernmatrix identifiziert werden. Geplant sind deshalb detaillierte *in vitro* DNA-Protein-Interaktionsstudien, die Aufschluss über die einzelnen Protein-Interaktionspartner geben sollen. Die ersten Experimente in dieser Richtung sind, die Bindungskapazitäten unterschiedlicher S/MAR-Elemente an das Kernmatrixprotein SAF-A zu testen. SAF-A enthält als S/MAR-bindendes Motiv die SAF-Box, die in vielen verschiedenen Proteinen von der Hefe bis zum Mensch hoch konserviert ist. Koppelt man diese 45 Aminosäure große SAF-Box über einen zusätzlichen Cystein-Rest an Sepharose-Säulen, so kann man über *pull-down assays* DNA-Sequenzen identifizieren, die an die SAF-Box binden können (Kipp et al. 2000). Für die *pull-down* Versuche werden destabilisierte DNA-Elemente mit Kernmatrix-Bindungspotential radioaktiv markiert. Binden diese Sequenzen an die SAF-Box, verbleibt die Radioaktivität in der Säule, ansonsten ist sie im Durchfluss zu finden. Dieser einfache Protein-Interaktionstest ermöglicht es, schnell eine größere Menge an identifizierten S/MAR-Elementen auf eine Interaktion mit SAF-A hin zu untersuchen und so erste eindeutige Aussagen über einen spezifischen Bindungspartner an der Kernmatrix zu machen.

Weiterhin geplant und in Arbeit sind Protein-Interaktionsstudien einzelner S/MAR-Elemente über *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA). Dieses Verfahren bietet sich vor allem an, wenn S/MARs mit DNase I HS kolokalisieren. Solche S/MAR-Bereiche sind - was durch ihre Hypersensitivität gezeigt wird - von der nukleosomalen Organisation ausgenommen und stehen damit für die Assoziation von anderen, vermutlich regulatorischen Proteinen wie Transkriptionsfaktoren zur Verfügung. Über EMSA-Studien ließen sich die spezifisch bindenden Transkriptionsfaktoren identifizieren und somit einige Details der biologischen S/MAR-Aktivitäten klären. Diese detaillierte Analyse würde auch zu einer besseren Klassifikation der S/MAR-Elemente führen.

Im Zeitalter der Chiptechnologie böte es sich auch an, einen Proteinchip zu erstellen, der nur Zellkernproteine beinhaltet. Ein Proteinchip bietet die Möglichkeit, mehrere Bindungspartner für eine DNA-Segment gleichzeitig zu detektieren und zu identifizieren. So kann in großem Umfang bestimmt werden, mit welchen Proteinen - ob Strukturproteinen oder Transkriptionsfaktoren - eine nicht-kodierende DNA-Sequenz interagieren kann. Um zu einem umfassenden Verständnis von S/MAR-Elementen und ihren Funktionen zu gelangen, wäre die Chiptechnologie der beste methodische Ansatz. Um zudem die Menge an nicht-kodierender Sequenzinformation auswerten zu können, die im Laufe des Humangenomprojekts entstanden ist, ist diese Proteomics-Methode zur Zeit die einzig denkbare. Mit dem Aufbau von umfassenden *protein libraries* rückt die Option eines Zellkern-Proteinchips in greifbare Nähe.

Zusätzlich zu den oben dargestellten *in vitro* Proteinbindungsstudien sollen S/MAR-Elemente zukünftig auch *in vivo* detaillierter untersucht werden. Ein Ansatz in diese Richtung ist die Identifizierung DNase I hypersensitiver Sites im Bereich von S/MAR-Elementen. Hypersensitive Sites koinzidieren häufig mit ausgeprägten, aber isolierten UEs, die einen S/MAR-Charakter aufweisen, und spielen dort eine Rolle bei genregulatorischen Prozessen (Mielke et al. 2002). Prominente, isolierte UEs sind auch in dem in dieser Arbeit analysierten intergenischem Fragment gefunden worden (Abb. 3.5). Da DNase I Hypersensitivität zudem eine typische Eigenschaft von LCRs ist, böte sich die Analyse auf DNase hypersensitive Sites vor allem in diesem Bereich an, um die eventuelle Beteiligung der intergenischen S/MARs an einer *locus control region* zu untermauern.

Für S/MAR-Elemente wurden - aufgrund ihrer Positionierung an Domänengrenzen, in der Nähe von Enhancern oder in Introns - unterschiedliche biologische Aktivitäten postuliert. Transkriptionssteigernde Aktivitäten sind auch in dieser Arbeit über das Luciferase-Reportersystem in stabilen Transfektionsversuchen untersucht worden (Abb. 3.8). Nicht untersucht wurde, ob die hier identifizierten S/MARs auch als Isolatoren fungieren können. Kriterien für eine Isolatorfunktion sind zum einen eine positionsunabhängige Genexpression, zum anderen die Blockierung einer Enhancerwirkung auf den Promotor (Bell et al. 2001). Einige Isolatoren, wie der *chicken HS4* Isolator, besitzen beide Fähigkeiten, die aber in unterschiedlichen Sequenzabschnitten lokalisieren (Recillas-Targa et al. 2002). Für spezifische Beispiele wurde gezeigt, dass Isolatoren eine Affinität zur Kernmatrix aufweisen (Nabirochkin et al. 1998). Ob S/MAR-Elementen selbst eine Isolatorfunktion zukommt, ist umstritten. Eine Isolatorfunktion ist gut in Einklang zu bringen mit S/MARs als Domänengrenzen (Antes et al. 2001). Das 3'-S/MAR-Element der humanen Apolipoprotein B Domäne zum Beispiel gewährleistet eine positionsunabhängige Expression in Mammaliazellen (Kalos und Fournier 1995) und in *Drosophila* (Namciu et al. 1998). Eine Isolatorfunktion ist aber nicht für alle S/MAR-Elemente zu finden. So konnte der abschirmende Effekt für das 5'-S/MAR der Apolipoprotein B Domäne nicht bestätigt werden (Antes et al. 2001). Diese Unterschiede in der Isolatorwirkung können wiederum in den verschiedenen biologischen Aktivitäten der S/MAR-Elemente ihre Ursache

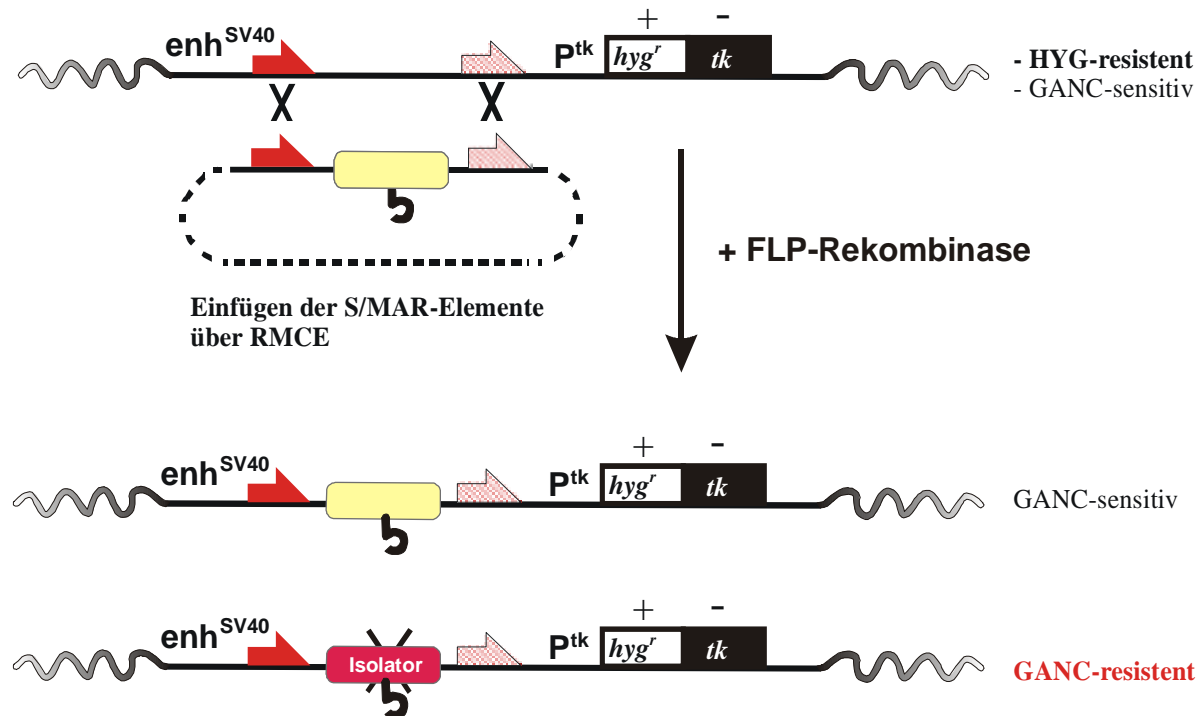


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der *insulator trap*

Das in der Grafik dargestellte Grundkonstrukt besteht aus dem Promotor der HSV-Thymidinkinase (P^{tk}), dessen Funktion durch den SV40-Enhancer unterstützt wird (enh^{sv40}). Der zwischen diesen beiden Elementen liegende DNA-Bereich wird von zwei heterospezifischen FRT-Sites (Pfeile) flankiert. In diesen Bereich können über einen Kassettenaustausch S/MAR-Elemente eingebracht und auf eine Isolatorfunktion hin untersucht werden. Besitzt ein S/MAR-Elemente eine Isolatorfunktion, verhindert das die Expression des Fusionsproteins hyg^{tk} . Die entstehenden Klone können deshalb aufgrund ihrer Ganciclovir-Resistenz isoliert und so Isolatorsequenzen identifiziert werden.

enh^{sv40} : SV40-Enhancer; P^{tk} : Promotor der Thymidinkinase; hyg^r : Hygromycin-Resistenz; tk : Thymidinkinase;

haben. Um S/MAR-Elemente dementsprechend weiter zu klassifizieren, bietet es sich an, sie systematisch auf eine Isolatorfunktionen hin zu untersuchen. Ein Verfahren dazu, welches in unserem Labor entwickelt wurde, ist das der *insulator trap* (Abb. 4.2). Das Konzept der *insulator trap* beruht auf einem Kassettenaustauschverfahren, dem sogenannten *FLP-Recombinase-Mediated-Cassette-Exchange* (RMCE) (Baer und Bode 2001). Der Promotorbereich des eingesetzten Grundkonstrukts besteht aus dem schwachen Promotor der HSV-Thymidinkinase (P^{tk}), dessen Funktion durch den SV40-Enhancer unterstützt wird (enh^{sv40}). Der zwischen diesen beiden Elementen liegende DNA-Bereich wird von zwei unterschiedlichen FRT-Sites (*FLP-Recombinase Recognition Target Sites*) flankiert. In diesen Bereich werden über einen FLP-Rekombinase vermittelten Kassettenaustausch verschiedene S/MAR-Elemente eingebracht. Findet nun über eine Isolator-Funktion ein *enhancer blocking* statt, wird die Expression des Fusionsproteins hyg^{tk} vermindert. Das hyg^{tk} -Gen besteht aus einer Fusion der Hygromycinphosphotransferase mit der Thymidinkinase. Vermindert sich nach dem Einbringen des S/MAR-Elements die Expression des Fusionsproteins, ist das über ein Negativselektion mittels Ganciclovir nachweisbar. Kultiviert man die Klone unter Zugabe von Ganciclovir, überleben nur diejenigen, deren tk -Funktion abgeschaltet ist. Somit ist die Isolatorfunktion des S/MAR-Elements nachgewiesen.

Der RMCE-Ansatz ermöglicht, zukünftig S/MAR-Elemente in großem Umfang auf ein *enhancer blocking* hin zu untersuchen bzw. aus willkürlichen genomischen Elementen solche mit Isolatorfunktion zu isolieren und auf eine S/MAR-Wirkung hin zu testen. Zum einen können bereits bekannte S/MAR-Elemente so funktionell analysiert werden, zum anderen ermöglicht das Konzept, neue Domänengrenzen zu kartieren. Solch funktionelle Studien werden, zusätzlich zu spezifischen Protein-Interaktionsstudien, helfen, die Wirkungsweise von S/MAR-Elementen - ob organisatorisch, transkriptionsfördernd oder abschirmend - besser zu verstehen.

4.2 Unterschiede zwischen eukaryontischen und prokaryontischen *unpairing elements* (UEs)

Ein Teilaspekt, der in dieser Arbeit beleuchtet wurde, ist die Herstellung artifizieller S/MARs aus prokaryontischen DNA-Sequenzen. Prokaryonten besitzen aufgrund ihrer Organisationsstruktur keine S/MAR-Elemente. Es existieren jedoch DNA-Bereiche, deren Erscheinungsbild im SIDD-Profil an eukaryontische, destabilisierte Sequenzen (UEs) erinnert. Solche Elemente sind unter anderem der Ampicillin-Promotor bzw. Terminator. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde belegt, dass sich die Aktivität eukaryontischer S/MARs zuverlässig aus deren SIDD-Profilen, also einem *unwinding*, ableiten lässt. Darauf basierend wurden artifizielle S/MAR-Elemente aus den UEs des Ampicillin-Promotors bzw. Terminators aufgebaut. Dazu wurden sowohl der Ampicillin-Promotor als auch der -Terminator oligomerisiert, um über eine Additivität der einzelnen UEs einen S/MAR-Charakter zu erreichen. Diese Versuche waren für den Promotor erfolgreich, für die Terminatorsequenz dagegen nicht (Abb 3.9). Das *unwinding* eines DNA-Bereiches ist damit ein notwendiges, aber kein hinreichendes Kriterium zur Schaffung von S/MAR-Aktivität. Die destabilisierten UEs der Pro- und Eukaryonten scheinen sich also in einigen Aspekten voneinander zu unterscheiden. Dieser Unterschied basiert nicht auf einer Prokaryonten-spezifischen Methylierung der GATC-Sequenzen, was über S/MAR-Bindungsassays von nicht-methylierter Plasmid-DNA nachgewiesen werden konnte. Mutiert man dagegen die Ampicillin-Terminator Sequenz minimal, um sie bekannten eukaryontischen S/MAR-Elementen anzugleichen, kann ein S/MAR-Charakter der Elemente erreicht werden (Abb. 3.10). Dabei hängt dieser Effekt nicht von der Erhöhung des AT-Gehaltes ab.

Anscheinend ist es wichtig, dass bestimmte Nukleotid-Verteilungsmuster in der DNA auftreten, damit Kernmatrix-Proteine binden können. Solche spezifischen Sequenzmuster können zum einen identifiziert werden, indem eine ausreichend große Menge an S/MAR-Elementen charakterisiert und miteinander verglichen wird (Michalowski et al. 1999). Zum anderen besteht die Möglichkeit, artifizielle S/MARs mit unterschiedlichen Sequenzmotiven herzustellen. Dies ist zum Beispiel von Tsutsui und anderen mit einer 26 bp großen mutierten Sequenz aus der Promotorregion des humanen Histon H4 Gens gemacht worden (Tsutsui 1998). Dieser DNA-Bereich enthält zwei *AT-Patches* in einem GC-reichen Kontext. Oligomere dieser 26 bp großen Sequenz binden effektiv SAF-A, wobei es auf die Orientierung der Monomere ankommt: sowohl alternierende als auch ausschließlich direkte Concatemere zeigen keine effektive Proteinbindung. Auch der Abstand zwischen den einzelnen *AT-Patches* ist für eine starke SAF-A Bindung entscheidend. Um das Phänomen der *AT-Patches* genauer zu verstehen, wollen Tsutsui und Mitarbeiter eine Reihe von Hexa-Concatemeren mit unterschiedlichsten Monomer-Orientierungen systematisch untersuchen. So kann bestimmt werden, wie die Anordnung der Homopolymere die Bindungsstärke beeinflusst. Ein Verständnis der Verteilung dieser AT-Homopolymere würde auch helfen, die Unterschiede zwischen eu- und prokaryonti-

schen *unpairing elements* zu erklären.

Vergleicht man die Genome unterschiedlicher Organismen miteinander, so findet man eine spezifische Anreicherung von Homopurin-Homopyrimidin Wiederholungen im Genom von Eukaryonten. Im Genom von Prokaryonten dagegen sind solche Sequenzmotive unterrepräsentiert (Cox und Mirkin 1997). Symmetrische Sequenzwiederholungen stellen in Prokaryonten fast niemals eine direkte Wiederholung dar, sondern sind als *inverted repeats* angeordnet. Bei Eukaryonten handelt es sich bei Sequenzwiederholungen dagegen in hohem Maße um Homopurin-Homopyrimidin *mirror repeats*. Weiterhin unterscheidet sich der GC-Gehalt der in den verschiedenen Organismen gefundenen Sequenzmotive signifikant. Der GC-Gehalt prokaryontischer Sequenzwiederholungen entspricht dem der durchschnittlichen DNA-Zusammensetzung. In Eukaryonten besitzen *direct mirrored repeats* nur einen GC-Gehalt von 10-20% (Cox und Mirkin 1997). Die Überrepräsentation von symmetrischen *repeats* im Eukaryontengenom wirft die Frage nach deren Funktion und Erhaltung auf. Da solche Sequenzwiederholungen vor allem in nicht-kodierenden Bereichen des Genoms lokalisiert sind, haben sie nach heutigem Erkenntnisstand wahrscheinlich eine Funktion in der DNA-Organisation, unter anderem auch als S/MAR-Elemente (Bode et al. 2000a). Motivbeispiele für direkte AT-Sequenzwiederholungen in S/MAR-Elementen sind unter anderem ATTTTA (Boulikas 1993) oder TCTTTAATTCT (Bode et al. 1992). Die hier dargestellte unterschiedliche *repeat* Zusammensetzung in den pro- und eukaryontischen UEs könnte den in dieser Arbeit beschriebenen Unterschied im S/MAR-Bindungspotential der oligomerisierten UEs ausmachen.

Beim Ampicillin-Terminator reichen fünf Punktmutationen pro 161 bp aus, um mit steigendem Oligomerisierungsgrad einen S/MAR-Charakter zu erreichen (Abb. 3.10). Es würde sich anbieten, die Anzahl an Mutationen weiter zu reduzieren, um neue signifikante S/MAR-Motive, die für das veränderte Bindungsverhalten verantwortlich sind, zu identifizieren. Weiterhin ließe sich so die Verteilung der für eine Matrixprotein-Bindung wichtigen *AT-Patches* und *repeats* weiter eingrenzen. Ob die artifiziellen S/MARs eine ähnliche biologische Wirksamkeit wie die eukaryontischen S/MAR-Elemente besitzen, soll über Isolator- und *augmentation*-Funktionstests zukünftig untersucht werden (s.o.).

Eindeutig gezeigt werden konnte, dass der Charakter prokaryontischer UEs teilweise abweicht von dem eukaryontischer destabilisierter DNA-Sequenzen. *Unwinding* ist demzufolge eine hinreichende Voraussetzung für die Existenz eukaryontische S/MAR-Elemente, dieses Kriterium lässt sich auf prokaryontische DNA jedoch nicht einfach übertragen. Ein genauer Vergleich der Unterschiede in der molekularen Zusammensetzung der UEs wird helfen, das Aktivitäts- und Wirkprinzip von S/MAR-Elementen in Eukaryonten besser zu verstehen.

4.3 In-situ Analyse der DNA-Kernmatrix Interaktion

Traditionell sind S/MAR-Elemente *in vitro* über S/MAR-Bindungsversuche identifiziert worden. Diese Versuche beinhalten eine Extraktion der löslichen Kernproteine und Histone. Aufgrund dessen ist häufig argumentiert worden, dass S/MAR-Elemente Artefakte darstellen, die an ein ebenfalls künstlich erzeugtes Proteingerüst binden (Hancock 2000). Bei der *in situ* Halo-FISH Analyse werden die zu untersuchenden Zellkerne vor der Extraktion auf einem Glasobjektträger fixiert. Diese Fixierung und der fehlende Abbau der extrahierten DNA-Schleifen über Restriktionsenzyme minimieren das Risiko, eine künstliche und ungeordnete DNA-Struktur zu erhalten. Die *in situ* Hybridisierung kommt damit dem *in vivo* Zustand der DNA-Organisation im Zellkern relativ nahe (de Belle et al. 1998, Rättsch et al. 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Methode der Halo-FISH Analyse eingesetzt worden, um vornehmlich zwei Aspekte näher zu untersuchen: (a) die Mobilität endogener DNA-Gendomänen und multipler integrierter Transgenkopien (siehe 4.3.1); (b) die Integrationsspezifität von Infektanten bzw. Elektroporanten in definierte genomische Loci (siehe 4.3.2). Diese beiden Aspekte sollen im folgenden getrennt betrachtet werden.

4.3.1 FISH-Analysen zum Nachweis von S/MAR-Bindungsverhalten *in situ*

Was die Integration von multiplen Transgenkopien betrifft, so konnte am Beispiel der IFNB1-Domäne gezeigt werden, dass nicht alle integrierten Gendomänen an die Kernmatrix binden. Das ist erstaunlich, weil alle Transgenkopien von dem starken SAR-E Element flankiert werden. S/MAR-Eigenschaften scheinen also notwendig, aber nicht hinreichend zu sein, um eine Bindung an die Kernmatrix zu vermitteln. Das ist bei den hier untersuchten Mehrfachkopie-Integraten besonders auffällig, da die integrierten SAR-E Elemente molekularbiologisch identisch sind und man annehmen sollte, dass sich das auch im Assoziationsverhalten widerspiegelt.

Die Anzahl an IFNB1-Genen, die bei den untersuchten Klonen K25 (2 Kopien), K9 (12 Kopien), K4 (35 Kopien) und 2_4 -Zellen (100 Kopien) an die Kernmatrix bindet, nimmt - prozentual gesehen - mit der Kopienzahl ab. Während bei wenigen integrierten IFNB1-Domänen, wie bei K25 mit 2 Kopien, diese zum Großteil ausschließlich an der Kernmatrix lokalisiert sind, so findet man bei einer höheren Kopienzahl (>12) überwiegend Mischzustände vor (Abb. 3.14). Mischzustand bedeutet, dass die integrierten Transgenkopien in einer DNA-Halo sowohl an der Kernmatrix als auch in der DNA-Schleifen lokalisiert sind. Die spezifischen Verteilungsmuster der in dieser Arbeit analysierten Klone sind in Abbildung 4.3 tabellarisch zusammengefasst. Deutlich zu erkennen ist, dass bei einer hohen Kopienzahl die Transgene sowohl an der

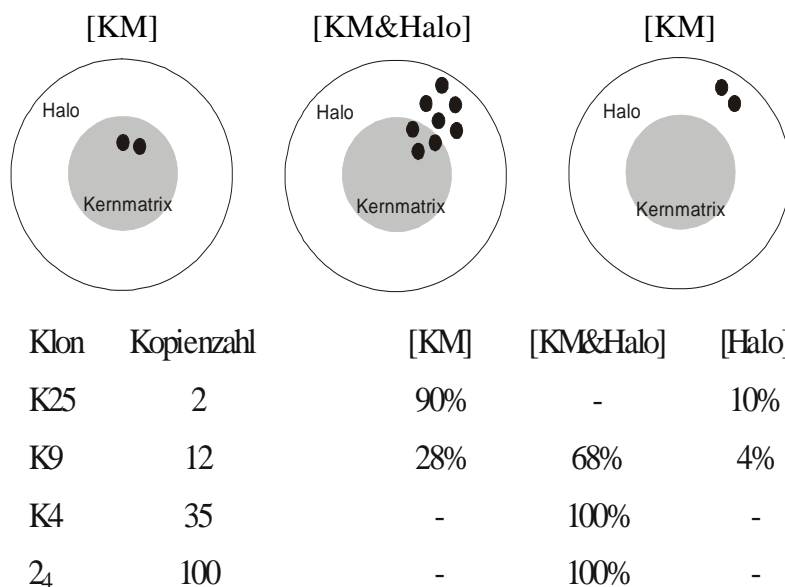


Abb. 4.3 Verteilungsmuster der integrierten SAR-E Elemente laut FISH-Analyse

Die Abbildung fasst die Verteilung der integrierten IFNB1-Transgene für die untersuchten Klone tabellarisch zusammen. Die verschiedenen Verteilungsmuster sind zudem über der Tabelle skizzenhaft dargestellt.

KM: Kernmatrix

Kernmatrix als auch in der DNA-Halo zu finden sind (siehe auch Skizze in Abb. 4.3). Dabei ändert sich mit der Kopienzahl die prozentuale Verteilung der integrierten SAR-E Elemente. Bei Klon K9 finden sich pro DNA-Halo ein bis zwei Transgen-Domänen in der Schleifenfraktion, bei Klon K35 ca. 15 und bei 2_4 -Zellen konnten sogar um die 75 Kopien in der DNA-Halo detektiert werden. Das bedeutet, dass bei 2_4 -Zellen maximal 25% der integrierten Transgene an die Kernmatrix binden, bei Klon K9 sind es immerhin noch 80-90%.

Diese Verteilung ist so nicht erwartet worden, da laut *in vitro* S/MAR-Bindungsversuchen ca. 3000 SAR-E Elemente bis zur Sättigung an die Kernma-

trix binden können (Mielke et al. 1990). Eine Sättigung der endogenen S/MAR-Bindungsplätze erscheint deshalb für das Auftreten der SAR-E Elemente in der DNA-Halo zunächst unwahrscheinlich. Berücksichtigt man jedoch, dass die Assoziation der multiplen Transgenkopien - anders als bei den *in vitro* Analysen - auf einen kleinen Bereich an der Kernmatrix beschränkt ist (Abb. 3.14, 3.15 und 3.16), wäre es möglich, dass für diesen Locus die maximale Bindungskapazität überschritten wurde. Ein weiteres Indiz für diese Sättigung ist, dass sich der Assoziationsstatus auch nach einer Induktion der IFNB1-Transkription nicht signifikant verändert (Abb. 3.16 und 3.17). Eine aktive Transkription findet in Zellen an der Kernmatrix statt (Vassetzky et al. 2000), deswegen würde man vor allem zu Beginn der IFNB1-Transkription einen Großteil der integrierten Genkopien an der Kernmatrix erwarten. Das ist jedoch nicht der Fall, der Assoziationsstatus der multiplen IFNB1-Domänen verändert sich zu keinem Zeitpunkt der Transkription. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass an einem Integrationsort nur eine begrenzte Anzahl an IFN-B1 Genen einen Zugang zur Kernmatrix hat und somit transkriptionell aktiv ist. Frühe Publikationen über tierische Zellen gehen davon aus, dass die Expressionshöhe von S/MAR-flankierten Transgenen proportional der Kopienzahl zunimmt (Stief et al. 1989). Aktuellere Arbeiten konnten diesen Trend jedoch nicht bestätigen (Bonifer et al. 1994, Phi-Van und Strätling 1996). Der hier beobachtete limitierte Zugang der integrierten Transgene zum Transkriptionsapparat könnte eine Begründung für diese Abweichung sein. Für eine biotechnologische Anwendung ist daher eine Kopienzahlerhöhung, wie zum Beispiel im Falle des Dihydrofolat-Reduktase Gens über eine Methotrexatbehandlung, nicht empfehlenswert (Schimke et al. 1984). Zum einen erhöht sich die Expressionsrate nicht linear mit der Kopienzahl, zum anderen können multiple integrierte Gene ein *gene silencing* induzieren (Bingham et al. 1997).

Der beschränkte Zugang von S/MAR-Elementen zur Kernmatrix resultiert in einer Dynamik der S/MAR-Kernprotein Interaktion. Diese Variabilität ist besonders deutlich für Klon K25, dessen integrierte IFNB1-Kopien zu 90% an der nukleären Matrix, zu 10% aber ausschließlich in der DNA-Halo zu finden sind. Andererseits erkennt man die Dynamik bei der Hybridisierung des endogenen IFN-Genclusters. Die Hybridisierung dieser 400 kb großen Domäne hat gezeigt, dass unterschiedliche DNA-Bereiche variabel als Ankersequenzen genutzt werden (Abb. 3.21). Diese Dynamik konnte in verschiedene Zelltypen wie MG63-Zellen oder Lymphozyten beobachtet werden. Die dynamische Nutzung von S/MAR-Elementen konnte auch bei der Untersuchung der *Xenopus* rDNA, c-myc und 5S Genexpression festgestellt werden (Vassetzky et al. 2000). In diesem Modellsystem konnte gezeigt werden, dass die oben genannten Gene über S/MAR-Elemente spezifisch an die Kernmatrix binden, wenn sie aktiv transkribiert werden. Ähnliches konnte für bestimmte S/MAR-Sequenzen während der T-Zellaktivierung festgestellt werden (de Belle et al. 1998, Cai und Kohwi-Shigematsu 1999). Ein Modell für die beobachtete Dynamik und Variabilität ist in Abbildung 4.4 dargestellt (Heng et al. eingereicht). Das hier vorgestellte Modell ist an das sogenannte *pulling model* angelehnt, welches von einem *pulling through* eines transkribierten Gens durch die Transkriptionsmaschinerie ausgeht (Cook 1999). Bevor eine aktive Transkription stattfinden kann, müssen die betreffenden Gene einen Zugang zum Transkriptionsapparat der Zelle und damit zur Kernmatrix haben. Solch ein Zugang kann durch S/MAR-Elemente erleichtert werden. Diese Annahme ist auch konsistent mit der Beobachtung, dass die Induktion der IFNB1-Transkription mit einer verstärkten Bindung der moderaten S/MAR-Elemente C und D einhergeht, die das IFNB1-Gen direkt flankieren (Bode und Maass 1988). Nach einer Transkriptionsinitiation findet die Elongation statt, während der die DNA-Schleife durch die Matrix-assoziierte RNA Pol II gezogen wird. Zum Ende der Transkription löst sich die DNA-Schleife von der Kernmatrix. Dieser

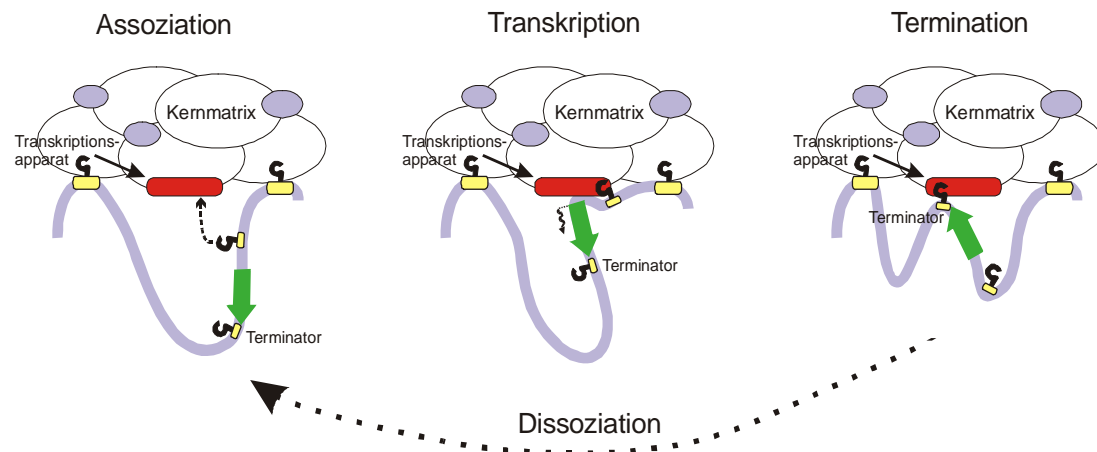


Abb. 4.4 Das modifizierte *pulling model*: Dynamik von S/MAR-Elementen

Das in dem Schema dargestellte Modell beschreibt die Variabilität in der Schlaufenstruktur abhängig von Prozessen wie der DNA-Transkription oder -Replikation. Abhängig von einer Induktion der Transkription transloziert das entsprechende Gen an die Kernmatrix. Diese Lokalisationsänderung kann von flankierenden, fakultativ genutzten S/MAR-Elemente bewirkt werden, die an die Kernmatrix aufgrund von topologischen Veränderungen während der Transkription binden. Nach der Initiation und Elongation der DNA-Transkription wird der Prozess über Terminationssequenzen beendet und die Domäne kehrt in ihren inaktiven Zustand zurück. Neben den fakultativ bindenden S/MAR-Elementen beinhaltet dieses Modell auch eine konstitutive Assoziation von einzelnen S/MAR-Elementen an die Kernmatrix, die so als Domänengrenzen fungieren und eine bestimmte DNA-Struktur aufrechterhalten.

Dissoziationsvorgang kann von den destabilisierten Terminatorsequenzen bewirkt werden (siehe Abschnitt 4.1).

Neben S/MAR-Elementen, die fakultativ und damit dynamisch an die Kernmatrix binden können, geht das modifizierte *pulling model* auch davon aus, dass es S/MARs gibt, die konstitutiv an die Kernmatrix gebunden sind. Über diese Bindung können DNA-Domänen voneinander abgegrenzt und so die DNA-Regulation aufrechterhalten werden. Da S/MARs bis heute noch nicht in großem Umfang klassifiziert worden sind, ist nicht klar, welche Elemente diese Rolle in der Organisation des Chromatins übernehmen. Denkbar wäre, dass die in dieser Arbeit charakterisierten intergenischen S/MAR-Elemente konstitutive DNA-Anker bilden, wohingegen die Variabilität in den DNA-Schlaufen durch genassoziierte S/MAR-Elemente hervorgerufen werden könnte.

Ob eine S/MAR-Sequenz eher häufig oder selten an die Kernmatrix gebunden ist, hängt von den strukturellen und biologischen Funktionen des Elements ab. Wenige Kopien des SAR-E Elements sind *in situ* zu ca. 90% an der nukleären Matrix zu finden. Das SAR-E Element hat demnach eine starke Bindungsaffinität zur Kernmatrix, was sich durch seine Funktion bei der Interferon-Induktion begründen lässt: die Induktion der IFNB1-Transkription nach einer Virusinfektion erfolgt ad hoc (Bode et al. 1986). Für ein derart schnelles Anschalten der Genexpression muss ein Gen einen konstanten Zugang zur Kernmatrix und damit zum Transkriptionsapparat der Zelle haben. Dieser Zugang kann durch das SAR-E Element vermittelt werden. Im Vergleich dazu wäre es interessant, die IFNB1-Domänenorganisation in Zellen zu untersuchen, in denen die Domäne nicht aktiv ist. Das Interferonsystem wird erst im Laufe der Embryonalentwicklung und der Zelldifferenzierung aktiviert. Eine inaktive Gendomäne sollte aufgrund molekularbiologischer Modifikationen, wie zum Beispiel der Histon-Methylierung

und -Deacetylierung, im Inneren eines Chromsomenterritoriums und damit - laut unserer Modellvorstellung - nicht an der Kernmatrix zu finden sein (Cremer und Cremer 2001). Deshalb soll zukünftig der Assoziationsstatus der endogenen IFNB1-Domäne in embryonalen Stammzellen über FISH-Analysen untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit, um die Lokalisation aktiver und inaktiver Gendomänen über FISH-Analysen zu bestimmen, ist die Charakterisierung der Oct4-Gendomäne. Das Oct4-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der für die Differenzierung der Blastozyste während der Maus-Embryonalentwicklung essentiell ist (Ovitt und Schöler 1998). In adulten Zellen dagegen ist die Oct4-Domäne inaktiv und stark methyliert (Gidekel und Bergman 2002). Ist die Annahme der Lokalisation aktiver Gendomänen an der nukleären Matrix korrekt, müsste sich auch hier eine Veränderung der Gen-Aktivität in der DNA-Schlaufenstruktur widerspiegeln.

Weitere Versuche, die für die Zukunft geplant sind, betreffen die Transkription der mRNA an der Kernmatrix. Um die Annahme zu bestätigen, dass nur diejenigen IFNB1-Transgene in Multikopie-Klonen transkribiert werden, die an der Kernmatrix lokalisiert sind, würde sich eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der neu synthetisierten IFNB1-mRNA anbieten. Dieses Verfahren ist bei einer Halo-FISH Hybridisierung jedoch relativ kompliziert. Durch eine Detergensbehandlung wird bei der Herstellung der DNA-Halos die Zellmembran zerstört, so dass die freigesetzte RNA durch RNasen leicht abgebaut werden kann. Vor allem bei multiplen Genkopien ist eine eindeutige Unterscheidung von hybridisierter DNA und mRNA schwer. Denkbar wäre eventuell ein Abbau der DNA-Schlaufen nach der Extraktion über DNasen, so dass mRNA, die in der Schlaufenfraktion entstände, eindeutig nachgewiesen werden könnte.

4.3.2 S/MAR-Elemente und Transgenintegration

Gentransfer-Techniken werden eingesetzt, um die Genexpression in vielen Organismen zu verändern bzw. zu verbessern. In der Grundlagenforschung dienen diese Studien vor allem dem Verständnis der Genregulation. Ein Problem, welches bei solchen Experimenten häufig auftritt, ist die Schwierigkeit, einen Integrationsort im Genom zu finden, welcher die stabile Expression des Transgens über viele Generationen hin garantiert. Ein häufig auftretendes Phänomen ist das komplette Abschalten der Genexpression, was auch als *gene silencing* bezeichnet wird (Bingham 1997, Pikaart et al. 1998).

Über die genauen Integrationsmechanismen von Fremd-DNA nach einer Transfektion ist wenig bekannt. Deshalb wurden im Zuge dieser Arbeit provirale Einzelkopieklone untersucht, die entweder über retrovirale Infektion oder Elektroporation generiert wurden. FISH-Analysen dieser BHK-Klone haben gezeigt, dass die Gentransfermethode den Integrationsort im Genom bestimmt. Während die provirale DNA in Elektroporanten vor allem in der DNA-Halo zu finden ist, dominiert eine Kernmatrix-Assoziation in den Infektanten (Abb. 3.24). Dabei spielt eine hohe Transgenexpression für die Kernmatrix-Lokalisation eine untergeordnete Rolle.

Dass eine DNA-Integration nach einer retroviralen Infektion vorwiegend an S/MAR-Elementen stattfindet, ist bekannt (Mielke et al. 1996). Dass die S/MAR-Aktivität auch nach der Integration von Fremd-DNA erhalten bleibt, konnte hier erstmals über FISH-Analysen nachgewiesen werden. Die retrovirale Integration ist ein Enzym-katalysierter Prozess, an dem auch das Reparatursystem der Wirtszelle beteiligt ist (Shih et al. 1988). Da dieses Reparatursystem an der Kernmatrix lokalisiert ist (Boulikas 1995), ist eine provirale DNA-Integration in der Nähe von S/MAR-Elementen nicht unerwartet. Retroviren sind darüber hinaus darauf angewiesen, dass nach dem Einbau eine Expression des Provirus erfolgt (Scherdin et al. 1989). Auch das spricht für S/MAR-Elemente als Integrationsorte nach einer retroviralen Infektion.

In dieser Arbeit konnten zum erstenmal Integrationsorte nach einer Elektroporation

näher spezifiziert werden. Eine DNA-Integration nach einer Elektroporation findet an bereits existierenden Strangbrüchen in der DNA statt (Scangos und Ruddle 1981, Bode et al. 2000b). Doppel- bzw. Einzelstrangbrüche, die eine Integration von Fremd-DNA ermöglichen, sind häufig die Folge von Fehlern in der DNA-Replikation oder -Transkription. Weiterhin koinzidieren Strangbrüche in der DNA häufig mit Topoisomerase II-Bindungsstellen. Topoisomerase II ist eine bekannte Komponente der Kernmatrix (Gasser et al. 1986, Mirkovitch et al. 1988). Es wäre also durchaus möglich, dass über Elektroporation generierte Zellklone auch eine Assoziation zur Kernmatrix zeigen. Das ist - laut unseren Ergebnissen - jedoch nicht der Fall. Eine maximale Kernmatrix-Assoziation von um die 50% ist in der Gruppe der Hochexprimierer zu finden, wohingegen die Niedrigexprimierer eine durchschnittliche Assoziation von 37% zeigen. Damit sind die integrierten Transgene zum Großteil in der DNA-Halo lokalisiert. Die DNA-Strangbrüche, die während der Elektroporation für die DNA-Integration verwendet werden, koinzidieren also nicht mit endogenen S/MAR-Elementen.

Die Bindung der integrierten Transgene an die nukleäre Matrix unterliegt auch in dem hier untersuchten Fall einer Dynamik. Bei den Infektanten sind - unabhängig von der Genexpression - ca. 20-25% der Transgene in der DNA-Halo zu finden. 75-80% der hybridisierten Proviren sind dagegen an der Kernmatrix lokalisiert. Die Lokalisationsänderung zwischen der Kernmatrix und der DNA-Halo in einem Klon kann durch das oben vorgestellte *pulling model* erklärt werden. Die S/MAR-Elemente, in die die retrovirale DNA integriert ist, können aufgrund von transkriptionellen Veränderungen in der DNA-Umgebung dissoziieren. Die durch die Transkription induzierten topologischen Effekte führen zur Strangtrennung und Sekundärstrukturbildung, was in einer veränderten DNA-Domänenstruktur resultiert (Heng et al. eingereicht). So entstehen die Zellkernfraktionen, in denen das Transgen in der DNA-Halo zu finden ist. Bei den hier untersuchten Elektroporanten ist die beobachtete Variabilität noch größer. Ein Grund dafür ist, dass die elektroporierten Transgene nicht direkt in S/MAR-Elemente integriert sind und deswegen keine bevorzugte Bindung an die Kernmatrix zeigen. Für die Gruppe der elektroporierten Hochexprimierer findet man eine 50%ige, für die der Niedrigexprimierer eine 37%ige Assoziation. Hier spiegelt sich die transkriptionelle Aktivität der Transgene in der Kernmatrix-Assoziation wider. Transkriptionell aktive Integrate werden über eine Chromatindomänen-Reorganisation an die nukleäre Matrix gebracht. Dies erfolgt analog dem *pulling model*. Transgene, die im Verhältnis häufiger transkribiert werden, sind deshalb auch häufiger an der Kernmatrix zu finden. Daraus resultieren die Unterschiede zwischen der Gruppe der Hoch- und der der Niedrigexprimierer bei den elektroporierten Klonen. Bei Elektroporanten wird die transkriptionsabhängige Kernmatrix-Assoziation nicht durch eine an sich erhöhte, S/MAR-vermittelte Matrixbindung des Integrationsortes überdeckt. Ein Zugang der proviralen DNA zur nukleären Matrix kann in Elektroporanten über S/MAR-Elemente in der näheren Umgebung erfolgen, was auch zu einer Dynamik in der DNA-Domäne beiträgt.

Neben den stabil exprimierenden Einzelkopieklonen sind in dieser Arbeit auch vier Klone mit einem instabilen Expressionsprofil näher analysiert worden (Abb. 3.28 und 3.29). Diese Klone schalten die Transgenexpression in einigen Zellen bei einer Kultivierung ohne die Selektionsdroge G418 komplett ab. Besonders auffällig ist dieser Effekt bei den Elektroporanten. Hier sinkt die Expression in allen Zellen auf Null ab. Da das integrierte Provirus in den untersuchten Zellen noch intakt ist, kann es sich bei dem beobachteten Phänomen nur um ein klassisches *gene silencing* handeln. Solch ein *gene silencing* kann über Modifikationen wie der CpG DNA-Methylierung vermittelt werden. Die Bestimmung des Methylierungsstatus der instabilen Klone über Verfahren wie zum Beispiel der Bisulfit-Sequenzierung würde sich demnach anbieten (Frommer et al. 1992). Bei den instabilen Elektroporanten verursacht das

Abschalten der Transgen-Expression keine feststellbare Veränderung in der Kernmatrix-Assoziation. Das ist nicht weiter verwunderlich, da die instabilen Elektroporanten zur Gruppe der niedrigexprimierenden BHK-Klone gehören, deren Transgene an sich nur eine geringe Bindungsaktivität zeigen. Eine instabile Transgenexpression betrifft auch wenige Zellen in Klonen, die über eine retrovirale Infektion generiert wurden. Dabei verändert sich in Klon I10 die Kernmatrix-Assoziationsfrequenz nicht signifikant, wohingegen die provirale DNA in Klon I18 nur zu etwa 60% an der Kernmatrix lokalisiert ist.

Dass die Genexpression in Infektanten teilweise abgeschaltet werden kann, ist insofern ungewöhnlich, als dass das Provirus in S/MAR-Elemente integriert ist und so vor einer Geninaktivierung geschützt sein sollte (Forrester et al. 1999). Eine mögliche Erklärung für das *gene silencing* in den instabilen Infektanten ist, dass eine DNA-Integration in S/MAR-Elementen zu einer Translokation im Genom führen kann. Für den humanen IFN-Gencluster sind zum Beispiel zwei Bruchpunkte mappiert worden, die beide im Bereich von *scaffold attachment regions* liegen (Bode et al. 2000b). Wird bei der retroviralen Integration eine genomisch instabile Region getroffen, kann das zu Umstrukturierungen der betroffenen DNA-Domäne führen, ohne dass in jedem Fall die Kernmatrix-Assoziation verloren gehen muss (vgl. Klon I10 und I18). Die Transkriptionsstabilität dagegen würde von solchen Reorganisationen nachhaltig beeinflusst werden, da häufig über eine DNA-Methylierung die Expression eines translozierten Locus abgeschaltet wird (Nakamura et al. 1999).

Betrachtet man die hier gezeigten Integrationsergebnisse unter einem gentherapeutischen Gesichtspunkt, böte sich vor allem die Sequenzierung der instabilen Integrationsorte an. Dazu könnten Methoden wie die inverse PCR eingesetzt werden (Mielke et al. 1996). Ziel solch einer Sequenzbestimmung ist unter anderem ein besseres Verständnis bezüglich einer stabilen Gentherapie. Heutzutage übliche gentherapeutische Ansätze basieren auf dem retroviralen Gentransfer. Kürzlich gemachte klinische Versuche, um über diese Methode den Immundefekt *severe combined immunodeficiency-X1* (SCID-X1) zu therapieren, haben gezeigt, dass die retrovirale Infektion sekundäre Leukämien auslösen kann (Cavazzana-Calvo et al. 2000, Marshall 2002). Aufgrund dessen wurden die Experimente bis auf weiteres eingestellt. Eine mögliche Erklärung für das Auslösen sekundärer Leukämien könnte die Integration der proviralen DNA in fragile instabile genomische Bereiche sein (s.o.). Integriert provirale DNA in genomische Bruchpunkte, kann das zu Deregulationen in einer DNA-Domäne führen (Barker et al. 1991, Mielke et al. 2002). Die Integration von Fremd-DNA in instabile Regionen könnte darüber hinaus in Translokationen im Genom resultieren. Die Risiken, sekundäre Erkrankungen über eine stabile Transgen-Integration auszulösen, machen eine bessere Charakterisierung der Transgen-Integrationsorte für eine kalkulierbare Gentherapie dringend erforderlich.

4.4 S/MAR-Elemente: ein Fazit

Im Zuge des voranschreitenden „Genom-Zeitalters“ kommt dem Verständnis der Zellkernarchitektur eine immer wichtigere Rolle zu. Einen großen Anteil an dieser DNA-Architektur haben die hier vorgestellten S/MAR-Elemente. S/MAR-Elemente werden spezieübergreifend erkannt, ihre Lokalisation ist zum Teil hoch konserviert (Allen et al. 2000). *Knock-out* Experimente im Bereich des Immunglobulin μ schwere Kette Locus haben gezeigt, dass S/MAR-Elemente eine essentielle Rolle in der differentiellen Genregulation übernehmen können (Forrester et al. 1994). Da S/MAR-Elemente keinen Konsensus hinsichtlich ihrer Primärsequenz besitzen, ist die Entwicklung von zuverlässigen Vorhersagealgorithmen

unerlässlich. Die hier vorgestellte SIDD-Analyse ist ein effektiver Ansatz in diese Richtung. Um S/MAR-Vorhersagemethoden weiterhin verbessern zu können, muss die Menge an reproduzierbar getesteten S/MAR-Elementen jedoch deutlich erhöht werden. Gleichzeitig ließe sich so die S/MARt DB Datenbank ausbauen, in der zur Zeit 313 verschiedene S/MAR-Elemente verzeichnet sind (Liebich et al. 2002). Mit einer größeren Menge an identifizierten S/MAR-Elementen böte sich auch die Möglichkeit, diese zukünftig in funktionelle Gruppen zu klassifizieren. S/MARs können diverse biologische Funktionen im Bereich der Genomorganisation und Genregulation innehaben: (a) S/MARs können als Domänengrenzen mit Isolatorfunktion fungieren; (b) S/MARs sind im Termintorbereich von funktionellen Genen zu finden; (c) S/MAR Elemente können mit einer *augmentation*-Funktionen assoziiert sein; (d) S/MARs können am Aufbau einer *locus control region* beteiligt sein. Zur Zeit ist außerdem nicht klar, welche Funktionen die intergenischen S/MARs im Bereich der Zellkernarchitektur haben. Betrachtet man die Diversität der S/MAR-Aktivitäten und die Zusammensetzung der verschiedenen S/MAR-Sequenzmotive, so wird die Erfordernis einer genauen Klassifizierung der S/MAR-Elemente deutlich. Es gibt nicht eine „Standard-Funktion“ von S/MAR-Elementen, sondern viele verschiedene Funktionen, die mit unterschiedlichen S/MAR-Klassen einhergehen könnten. Für eine gezielte Anwendung in der Forschung und der Gentherapie ist also zunächst ein genaues Verständnis der Funktionalität der individuellen S/MAR-Elemente erforderlich. Da bisher nicht gezielt zwischen den unterschiedlichen S/MAR-Aktivitäten differenziert wurde, könnte eine groß angelegte Charakterisierung auch helfen, eventuelle Konsensusmotive für verschiedene funktionelle S/MAR-Gruppen zu identifizieren.

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre geben zwar erste Einblicke in einzelne Teilaspekte der Zellkernarchitektur und deren funktionellen Einfluss, die Daten zu einem sinnvollen Ganzen zu vereinen ist aber noch nicht möglich. Da die Zellkernarchitektur offenbar eng mit den zentralen genetischen Prozessen der Genexpression und der DNA-Replikation verknüpft ist, lässt ihre Erforschung jedoch wichtige neue Ansatzpunkte zur Beeinflussung dieser Prozesse erwarten.

5. Material & Methoden

5.1 Geräte

| | |
|---------------------------|---|
| CCD-Kamera | Photometrics CoolSnap |
| Cleanbenches | Heraeus, HLB 2448 |
| | Heraeus, HSP 18 |
| | Mecaplex, Sterilcard Hood VBM600 und SG400 |
| Cytospin3 | ThermoShandon |
| Elektrotransformator | BioRad Gene Pulser II |
| ELISA-Reader | Wallace Victor Multiple counter plate reader |
| Exponierkammern | Molecular Dynamics 35 cm x 43 cm |
| Fluorometer | Hoefer DyNA Quant 200 |
| Gelelektrophoresekammer | BRL Horizon 1114 |
| | Gibco BRL Horizon 58 |
| | Gibco BRL Horizon 2025 |
| Hybridisierungsöfen | Robbins Scientific Hybridization Incubator Model 310 |
| | Stuart Scientific Hybridization Incubator |
| Kühlzentrifugen | Sigma 2K-15 |
| | Sigma 3K-20 |
| | Jouan CR412 |
| | Sorvall Superspeed RC5-C |
| | Festwinkelrotoren: GSA, GS3, SS34 |
| | Schwingbecherrotor: HB4 |
| Laborschüttler | Heidolph |
| Luminometer | Berthold Lumat LB9501 |
| Mikroskop | Olympus CK 2 |
| | Leitz Labovort |
| | Zeiss Axiovert TV 135 mit Fluoreszenzvorrichtung |
| Netzgeräte | Biorad Power Pac 300 |
| PCR-Maschine | Biometra T3 Thermocycler |
| pH-Meter | Φ 340, Beckmann |
| Phosphorimager | Molecular Dynamics |
| Scintillationszähler | Beckmann LS 6500 |
| DNA-Sequencer | LI-COR Long Readir 4200 |
| Thermomixer | Eppendorf Thermomixer 5436 |
| Tischzentrifugen | Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge fresco |
| | Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge pico |
| UV-Kammer | Hanau |
| Videograph | Biotec Fischer Video Densitometer |
| | Mitsubishi Thermodrucker und Personal Computer |
| Vortex | Scientific Industries Vortex Genie 2 |
| Wasseraufbereitungsanlage | Millipore Milli-Q |
| Zellkultur-Inkubatoren | Forma Scientific Water-jacketed Incubator Modell 3336 |
| Zellzähler | Schärfe System Casy 1 |

5.2 Materialien

Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen Bayer, Biolabs, Difco, Flow, Fluka, Gibco, Hoechst, Merck, Pharmacia, Promega, Qiagen, Roche Pharma, Serva, Sigma, Stratagene und USB verwendet.

Radiochemikalien wurden von Amersham-Buchler sowie Roche Pharma bezogen. Die Enzyme lieferten Amersham-Buchler, BRL, Biolabs, Pharmacia, Roche Pharma und USB. Fluoreszenzsonden wurden über die Firma Appligene Oncor bezogen.

Computerprogramme

Die Texte und Abbildungen dieser Arbeit wurden mit dem Programmpaket *Corel WordPerfect Office 2002* sowie der Programme *Adobe Photoshop 5.0* und *CorelDraw 10* erstellt. Tabellarische Kalkulationen wurden mithilfe von *Microsoft Excel* durchgeführt. *VCH Biblio 3.2* diente der Literaturverwaltung. Zur Literaturrecherche wurden *Medline* und *Current Contents* herangezogen.

Die Auswertung von Autoradiographien erfolgte mit *Image Quant Version 5.0* von Molecular Dynamics. Zur Durchführung von Sequenzanalysen und Restriktionskartierungen wurden *Vector NTI 5.0 und 7.0* von ATCC sowie das Programm *gcg* der Genetics Computergroup verwendet.

Filterpapiere und Transferfolien

| | |
|------------------|--|
| DEAE-Papier | Whatman 3MM |
| Nylonmembran | Biodyne B Transfer Membrane, Fa. Pall |
| Sterilfiltration | Sartorius Membranfilter, Porengröße 0.45 µm und 0.22 µm, d = 47 mm |

Zellkulturmaterialien

Das Plastik-Zellkulturmaterial für die eukaryontischen Zellen wurde von den Firmen Costar, Gibco, Greiner, Nunc und Seromed bezogen.

5.2.1 Plasmidvektoren

Liste der eingesetzten BAC-Klone

Die verwendeten Bac-Klone stammen aus der BAC-Bank RPCI11 und wurden am Roswell Park Cancer Institute in der Gruppe von P. deJong kloniert. Der Bac-Klonierungsvektor heißt *pBACe3.6* (Acc.Nr. U80929).

| Klon-Name | Accession-Number | Bemerkung |
|-----------|------------------|----------------------------|
| bA345P17 | AL353732 | umfasst Gene IFNA1-A13 |
| bA380P16 | AL162420 | umfasst Gene IFNA2-A17 |
| bA1P8 | AL512606 | umfasst Gene IFNWP18-IFNB1 |
| bA113D19 | AL390882 | umfasst Gene IFNW1-IFNB1 |

Plasmide

AT5Lu wie Lu (s.u.); 5' des SV40-Promotors befindet sich das 500 bp große Fragment AT5 aus dem 3'-Terminatorbereich des humanen β -Interferongens

- ELu** wie Lu; 5' des SV40-Promotors befindet sich das 2,2 kb große S/MAR-Fragment E aus dem 5'-Bereich des humanen β -Interferongens (Klehr 1991)
- Lu** Expressionsplasmid für Luciferase unter der Kontrolle des SV40-Promotors/Enhancers. Als Selektionsmarker dient das Gen für die Neomycinphosphotransferase angetrieben vom Tk-Promotor (Klehr et al. 1991; hier: pLu)
- 15Lu** wie Lu (s.o.); 5' des SV40-Promotors befindet sich das 567 bp große Fragment F20 (Goetze et al. 2003) aus dem intergenischen Bereich 5' des humanen β -Interferongens (Distanz ~ 36,8 kb)
- 23Lu** wie Lu (s.o.); 5' des SV40-Promotors befindet sich das 515 bp große Fragment F275 (Goetze et al. 2003) aus dem intergenischen Bereich 5' des humanen β -Interferongens (Distanz ~ 11,4 kb)
- 800Lu** wie Lu (s.o.); 5' des SV40-Promotors befindet sich ein 800 bp großes S/MAR-Fragment (ein Teilfragment von SAR-E) aus dem 5'-Bereich des humanen β -Interferongens (Klehr 1991)
- pAG60** Expressionsplasmid des Neomycinresistenzgens unter der Kontrolle des HSV/Tk-Promotors
- pCl** enthält das S/MAR₈₀₀-Fragment - ein Teilfragment des Eco RI-Fragments E des 5'S/MARs der IFN β -Domäne (Mielke et al. 1990)
- pCosIFN β** Cosmid der humanen IFN β -Domäne und der flankierenden S/MAR Elemente (Gross et al. 1981)
- pCR[®]-Blunt** Klonierungsvektor mit dem bakteriellen ccdB Lethalitätsgen und einer Kanamycinresistenz (Invitrogen)
- pCRampP** Klonierungsvektor mit verschiedenen Ampicillin-Promotor Sequenzoligomeren (Monomer 126 bp)
- pCRampT** Klonierungsvektor mit verschiedenen Ampicillin-Terminator Sequenzoligomeren (Monomer 161 bp)
- pCRampT5** Klonierungsvektor mit verschiedenen Ampicillin-Terminator Sequenzoligomeren, die pro 161 bp 5 Mutationen enthalten
- pCRampT10** Klonierungsvektor mit verschiedenen Ampicillin-Terminator Sequenzoligomeren, die pro 161 bp 10 Mutationen enthalten
- pTZ18R** Klonierungsplasmid, das als Selektionsmarker das Ampicillin-Gen enthält (Pharmacia; Acc.Nr. L08956)
- pTZE20** enthält das gesamte Eco RI-Fragment SAR-E 5' des IFN β -Gens, einkloniert in die Eco RI-Schnittstelle der *Multicloning-Site* des Klonierungsvektors pTZ18R (Mielke et al. 1990)
- pTZE2.2** enthält ein Eco RI-Fragment aus dem intergenen Bereich 3' vom IFNA1-Gen
- pTZ-PA7** enthält das Promotor-Fragment des humanen IFNA7 Gens, einkloniert in die Eco RI-Schnittstelle der *Multicloning-Site* des Klonierungsvektors pTZ18R (Goetze et al. 2003)
- pTZ-PA10** enthält das Promotor-Fragment des humanen IFNA10 Gens, einkloniert in die Eco RI-Schnittstelle der *Multicloning-Site* des Klonierungsvektors pTZ18R (Goetze et al. 2003)
- pTZ-TA7** enthält das Terminator-Fragment des humanen IFNA7 Gens, einkloniert in die Eco RI-Schnittstelle der *Multicloning-Site* des Klonierungsvektors pTZ18R (Goetze et al. 2003)
- pTZ-TA10-1** enthält ein Teilterminator-Fragment des humanen IFNA10 Gens, einkloniert in die Eco RI-Schnittstelle der *Multicloning-Site* des Klonierungsvektors pTZ18R (Goetze et al. 2003)
- pTZ-TA10-2** enthält ein Teilterminator-Fragment des humanen IFNA10 Gens, einkloniert in die Eco RI-Schnittstelle der *Multicloning-Site* des Klonierungsvektors pTZ18R (Goetze et al. 2003)
- pTZ-TA10-3** enthält das Terminator-Fragment des humanen IFNA10 Gens, einkloniert in die Eco RI-Schnittstelle der *Multicloning-Site* des Klonierungsvektors pTZ18R (Goetze et al. 2003)

- pTZWP1** enthält das Restterminator-Fragment des humanen IFNWP18 Pseudogens, einkloniert in die Eco RI-Schnittstelle der *Multicloning-Site* des Klonierungsvektors pTZ18R (Goetze et al. 2003)
- pTZ-4** enthält eine intergenische destabilisierte Sequenz aus der humanen WP18A10A7 Domäne, einkloniert in die Eco RI-Schnittstelle der *Multicloning-Site* des Klonierungsvektors pTZ18R (Goetze et al. 2003)
- pTZ 4-5** enthält eine intergenische stabile Sequenz aus der humanen WP18A10A7 Domäne, einkloniert in die Eco RI-Schnittstelle der *Multicloning-Site* des Klonierungsvektors pTZ18R (Goetze et al. 2003)
- pTZ-6** enthält eine intergenische leicht destabilisierte Sequenz aus der humanen WP18A10A7 Domäne, einkloniert in die Eco RI-Schnittstelle der *Multicloning-Site* des Klonierungsvektors pTZ18R (Goetze et al. 2003)

5.2.2 Primer (angegeben in 5'-3'-Orientierung)

Primersequenzen WP18A10A7:

F1fw: GTAATTCCGAATTCCCTCATTCCATTTAAGGACTCAGTAT
 F1rev: GAAATAGCGAATTCCCTTAAAAGTATCAATCCAAT
 PA10fw: GTAATTCCGAATTCTTCAATACATCAGTACTTGTGTCAA
 PA10rev: GAAATAGCGAATTCCGTATACCTCTACTTCACAGATAAA
 TA10-1fw: GTAATTCCGAATTCAAAGACTCACTTCTATAACCACGAC
 TA10-1rev: GAAATAGCGAATTCCCTTGGCATTCTTAAAGAATA
 TA10-2fw : GTAATTCCGAATTCTATTCTTTAAGATAAAATGCCAAGG
 TA10-3rev : ATCTACATTCTGCTAAGAGGAATTCATTGTTTTTTTACT
 F4fw: CTCTGCATATGGCTATCC
 F4rev: GTAATAAGTTTGGACCCCCC
 F4/5fw: GGGCATTGTTGGTTGGTTTCC
 F4/5rev: GCCCCATCGAAAAGTGGG
 F6fw: GTAATTCCGAATTCTTTAAGGACTCAGTATCTATAGGGC
 F6rev: GAAATAGCGAATTCCCTACGAGAACTAATTTTTGTACCC
 PA7fw: GTAATTCCGAATTCAATATCTGGATGAATACTGCAGCTA
 PA7rev: GAAATAGCGAATTCAATATCTGGATGAATACTGCAGCTA
 TA7fw: TTACAGCAGTTAGTATAACC
 TA7rev: CCTGTGCAGGCACTAGTCC

Primersequenzen Promotoren und Terminatoren:

PA2fw: GCCGAATTCCGGCACAAAATATAGTTAGA
 PA2rev: GAAGAATTCCTCACCACATTTTTTTCATT
 TA2(1)fw: GCCGAATTCTTTCTGCTATGACCATGACA
 TA2(1)rev: GAAGAATTCGTGGCTGTGGATGTTTCCTT
 TA2(2)fw: GCCGAATTCTTTCTGCTATGACCATGACA
 TA2(2)rev: GAAGAATTCGAAATGCAGGACACAGGTCC
 P-B1fw: GTGCAATTGCAATTCCTCTTATAAAACGTT
 P-B1rev: CAGCAATTGTATTCAGAGGAATTTCCCACTT
 T-B1fw: GCCGAATTCCTTTTACTTCATTAACAGACT
 T-B1rev: GAAGAATTCCTTCCAGCTTTCCTTTTCT

Primersequenzen intergenische Bereiche:

F20fw: GCCGAATTCTTCTAGTTACTTGAGGTGAAAA
 F20rev : GAAGAATTCGGGATAATTTCAATCAAGAGAAT
 F75fw: GTGCAATTGTAAAAGGTTGGGGTAGAGACAT
 F75rev: CAGCAATTGTTACCTCTGTATGTAGCTTTGC
 F100fw: GTGCAATTGCATCTCATACTCAAGATCTGTC
 F100rev: CAGCAATTGACTAATGTCCTAGCTCACACTC
 F180fw: GCCGAATTCAATCACAATGAAGCTTCTTATT
 F180rev: GAAGAATTCATTGGTTTGAAAAGCCACTTTT
 F230fw: GCCGAATTCATTCAGGAAGTTTAAATGTTC

F230rev: GAAGAATTCTAAGTGAGCAGGGGACATTTAA
 F275fw: GCCGAATTCAACAGTTCATTTAAATCATTACCAC
 F275rev: GAAGAATTCCTCCTAATCCCTATGTTGTTCA

Standardprimer:

M13fw: GTAAAACGACGGCCAGTGAA
 M13rev: CAGGAAACAGCTATGACCAT

RT-PCR Primer:

GAPDHfw: ACCACAGTCCATGCCATCAC
 GAPDHrev: TCCACCACCCTGTTGCTGTA
 IFNBfw: CATCAACTATAAGCAGCTCCA
 IFNBrev: TTCAAGTGGAGAGCAGTTGAG

Ampicillin Oligomerisierung:

AmpTfw: CAGTGGAACGAAAACCTCACG
 AmpTrev: GGTGCCTCACTGATTAAGCA
 AmpPfw: CGACACGGAAATGTTGAATA
 AmpPrev: CGGAACCCCTATTTGTTTAT
 AmpT5fw: ATCCTTTTATATTAAAAATGAAGTTTAAAAATCAATCTAAAATATATATGAGTAAACTTGG
 TCTGACAGTTACAAATGTTTAATCAGTGAG
 AmpT5rev: ATCCTTTTATATTAAAAATGAAGTTTAAAAATCAATCTAAAATATATATGAGTAAACTTGG
 GTCTGACAGTTACAAATGTTTAATCAGTGAG
 AmpT10fw: ATCCTTTTATATTAAAAATGAAGTTTAAAAATCAATCTAAAATATATATGAGTAAACTT
 GGTCTGACAGTTACAAATGTTTAATCAGTGAG
 AmpT10rev: CTAGGTTAAGATCTTTTTTGATAATCTCTTGACCAAAATCCCTTAACGTTACTTTTCGT
 TCCACTGGGTGCCTCACTGATTAACATTTGT
 Tfw: CAGTGGAACGAAAAGTAACG
 T10rev: GGTGCCTCACTGATTAACA
 T5rev: GGTGCCTCACTGATTAAGCA

5.2.3 Bakterienstämme (*E.coli*)

DH10B: [F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1
 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL end A1 nupG λ⁻ tonA]
 GM48: [F⁻ thr leu thi lacY galK galT ara fhuA tsx dam dcm glnV44]
 TOP10: [F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1
 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) end A1 nupG]
 XL1-Blue: [recA1 endA1 gyrA96 thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F⁺ proAB,
 lacI^qZΔM15, Tn10, (tet^r)]

5.2.4 Zelllinien

BHK-A Baby-Hamster-Nieren-Zelllinie, abstammend von BHK-21, (ATCC No. CCL-10)
 FS4 primäre Fibroblastenzelllinie aus menschlichen Vorhautzellen
 MG63 Humane Osteosarcomazelllinie (ATCC CRL1429)
 Ltk⁻ Murine Fibroblastenzelllinie, Derivat der L929-Zelllinie (ATCC CCL1); stabile Zelllinie mit defektem Thymidinkinase-Gen (Kit et al. 1963)
 2₄ klonale Linie von mit pCosIFNβ und pHC79 2cos/tk kotransfizierten Ltk⁻ Zellen; enthält 100 Kopien der IFNβ-Domäne (Hauser 1982)
 NIH/3T3 Embryonale Mausfibroblasten (ATCC No. CRL-1658)
 Vero Nebennieren-Zelllinie vom Affen mit defektem Interferon-Locus (ATCC CCL-81)

5.3 Allgemeine Grundtechniken

(nach Maniatis et al. 1982)

5.3.1 Sterilisieren

Glasgeräte werden vor Gebrauch 4 Stunden bei 180 °C hitzesterilisiert. Alle Lösungen werden entweder sterilfiltriert (0,22 µm Filter) oder autoklaviert (20 Minuten, 121 °C, 1 bar).

5.3.2 Phenolisierung von Nukleinsäuren

Phenol (Fa. Roth) redestilliertes, in TE äquilibriertes Phenol (pH 7,5-8,0); Zusatz von 0.1% (w/v) 8-Hydroxychinolin

TE 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)

Die wässrige Nukleinsäurelösung wird im Eppendorfgefäß mit 0,75 v/v an Phenol versetzt und auf dem Vortex-Mixer gemischt. Zur Phasentrennung ist eine kurze Zentrifugation notwendig. Durch Zugabe von 0,25 v/v Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) werden Phenolreste entfernt. Das durch Zugabe von 1 v/v an abs. Ethanol erhaltene Präzipitat wird zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE resuspendiert.

5.3.3 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung versetzt man 1 Volumen wässriger DNA-Lösung mit 1 Volumen 75 mM NaOAc in Ethanol, fällt für 2h bei RT und zentrifugiert anschließend 5 Minuten mit 1800 UpM bei 4 °C. Das Pellet wird zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, 10 min getrocknet und in TE gelöst.

5.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Fluorometrische Bestimmung

Hoechstfarbstoff H33258

Kalbsthymus-DNA Standard 100 µg/ml

10x TNE-Puffer 100 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 1 M NaCl (pH 7,4)

Färbelösung 0,1 µg/ml Hoechstfarbstoff in 1x TNE-Puffer

Die Nukleinsäure-Konzentration wird mit Hilfe eines Fluorometers ermittelt. Dazu werden 2 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung in 2 ml Färbelösung (vorgelegt in der Küvette) bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ angeregt und die Intensität der Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ gemessen. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgt durch 2 µl des DNA-Standards in 2 ml der Färbelösung.

Photometrische Bestimmung

Die Extinktion der Nukleinsäure wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht annähernd 50 µg DNA bzw. 35 µg RNA in 1 ml Volumen. Die optische Dichte ist hierbei abhängig vom GC-Gehalt der DNA-Lösung. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA mit einem 72%igem GC-Anteil beträgt die OD 1,04, während bei einem 30%igem GC-Anteil die OD 0,94 beträgt. Das Verhältnis der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Extinktion sollte für eine sorgfältig präparierte und proteinfreie Nukleinsäure bei 1,8 (DNA) und 2,0 (RNA) liegen.

Elektrophoretische Bestimmung

Geringe Nukleinsäuremengen lassen sich auch durch Elektrophorese eines Aliquots abschätzen. Die Fluoreszenzintensität der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ist ihrer Menge direkt proportional. Daher kann durch visuellen Vergleich der unbekannten Probe mit einer DNA bekannter Konzentration die unbekannte Menge abgeschätzt werden.

5.4 Arbeiten mit *E.coli*

5.4.1 Kultivierung von Bakterien

| | |
|-------------|--|
| LB-Medium | 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; autoklavieren |
| SOC-Medium | 20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ (SOB-Medium); autoklavieren; das autoklavierte SOB-Medium wird nach dem Abkühlen mit 20 mM Glucose (e.c.) versetzt |
| Agarplatten | Pro Liter LB-Medium werden 15 g Agar zugegeben. Zur Herstellung Ampicillin-haltiger Agarplatten wird 1/1000 Volumen Ampicillin einer sterilfiltrierten Stammlösung (50 mg/ml in Ethanol) beigemischt. Kanamycinplatten enthalten 50 µg/ml Kanamycin anstelle von Ampicillin. |

E. coli-Zellen werden in Flüssigmedien (LB ± Antibiotikum) bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Dazu werden 5 ml Kulturmedium mit einer *E. coli*-Kolonie (Einzelklone von Agarplatte) angeimpft. Nach 6-8 Stunden kann mit dieser Vorkultur die Hauptkultur mit einem Volumen von 50-1000 ml angeimpft werden.

5.4.2 Herstellung kompetenter Bakterien

1 l LB-Medium wird mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft. Man lässt die Zellen bei 37 °C unter starkem Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 wachsen und zentrifugiert sie anschließend 10 min in einem vorgekühlten GS3-Rotor bei 3000 UpM ab. Das Zellpellet wird nun in 1 l kaltem Wasser resuspendiert und wie beim erstenmal zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 500 ml kaltem Wasser aufgenommen und wiederum wie oben zentrifugiert. Nun wird das Pellet in 20 ml kaltem 10%igen Glycerin resuspendiert, wie oben beschrieben zentrifugiert und schließlich in einem Endvolumen von 2-3 ml 10%igem Glycerin resuspendiert. Die so aufgenommenen Zellen werden in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

5.4.3 Transformation von *E.coli*

Elektrotransformation

Bei der Elektrotransformation wird ein Gemisch aus DNA und kompetenten Zellen einem exponentiell abfallenden elektrischen Feld mit einer sehr hohen Ausgangsamplitude ausgesetzt. Die Transformationseffizienz liegt je nach Qualität der elektrokompenten Bakterien bei 10⁹-10¹⁰ Transformanten/µg DNA.

Ein 50 µl Aliquot der kompetenten Zellen wird bei Raumtemperatur aufgetaut und auf Eis

gestellt. 1 µl einer Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes wird hinzugegeben, gut gemischt, und der Ansatz wird in eine sterile, vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette pipettiert. Anschließend wird die Küvette in der Elektrotransformationskammer einem elektrischen Feld ausgesetzt. Pulse Controller und Gene Pulser werden auf 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω eingestellt. Die Zeitkonstante, die am Gerät überprüft werden kann, sollte zwischen 4-5 ms betragen, die elektrische Feldstärke beträgt dann 112,5 kV/cm. Danach werden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Kapsenbergröhrchen überführt und bei 37 °C 20-30 min geschüttelt. Anschließend werden unterschiedliche Mengen des Transformationsansatzes auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert. Man lässt die Klone über Nacht bei 37 °C heranwachsen und kann sie dann durch eine „Mini“- Plasmidpräparation charakterisieren.

Chemische Transformation

2 µl Ligationsansatz (ca. 25 ng Vektor-DNA) werden zu 50 µl kompetenten Zellen (TOP10) gegeben und der Ansatz wird 30 min auf Eis inkubiert. Nach 45 s Hitzeschockbehandlung bei 42 °C werden die Bakterien 2 min auf Eis gekühlt. Nach der Transformation werden 0,25 ml SOC-Medium zugegeben und der Transformationsansatz für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen werden in 10-100 µl Portionen auf entsprechenden antibiotikahaltigen LB-Agarplatten mittels eines Drigalski-Spatels ausplattiert.

5.4.4 Anlage von Glycerinkulturen

Zur kurzfristigen Lagerung werden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, bei 37 °C über Nacht inkubiert und im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt.

Eine langfristige Lagerung ist durch Vermischen einer 1 ml Übernachtskultur mit 87% Glycerin im Verhältnis 1:1 und Aufbewahren bei -20 °C oder -70 °C möglich.

5.5 Isolierung von Nukleinsäuren

5.5.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab: *Boiling Prep*

Diese Methode eignet sich zur DNA-Isolierung für alle E.coli Laborstämme (DH10B, XL1Blue). Vorteile liegen in der schnellen Durchführung (etwa 30 min) und in der hohen Qualität der DNA (basiert auf der *Boiling Prep* nach Holmes and Quigley).

| | |
|--------------------------|-------------------------|
| STET: | für 500 ml |
| 8% Sucrose | 40g |
| 0,5% Triton | 12,5 ml Triton 20% |
| 50 mM EDTA | 50 ml 0,5 M EDTA |
| 10 mM Tris (pH 8) | 5 ml 1 M Tris/HCl |
| LTE: | 10 mg Lysozym / 1 ml TE |
| 7,5 M NH ₄ Ac | |
| TER | 10 µg RNase A / 1 ml TE |

Eine *E.coli* 2 ml LB/TB-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum wird für 4-16 h bei 37 °C geschüttelt. Nach dem Umfüllen in 1,5 ml Eppendorfgefäße werden die Proben für 1 min bei 5000 UpM zentrifugiert. Die Pellets werden in je 500 µl STET-Puffer suspendiert und mit 50 µl LTE (10 mg/ml, bei -20 °C lagern) versetzt. Nach einer Inkubation von 2-3 min bei RT werden die Proben 90 s in einem Eppendorf-Thermomixer bei 95 °C inkubiert. Nach 5minütiger Zentrifugation (14000 UpM) bildet sich ein zähflüssiges Pellet, das mit einem

Zahnstocher entfernt wird. Es werden 50 µl 7,5 M NH₄Ac und 500 µl Isopropanol zugefügt, gevortext und die DNA für 5 min bei 14000 UpM pelletiert. Nach kurzem Trocknen wird das Pellet in 100 µl TER-Lösung (RNase A 10µg/ml) aufgenommen. Es werden 5 µl zur Restriktionsanalyse eingesetzt.

5.5.2 Präparative Plasmidisolierung

„Mini“ Plasmidpräparation

Um reine Plasmid-DNA für sich anschließende Sequenzierungen zu erhalten, wurden Säulenminipräparationen (Qiagen) durchgeführt. Die DNA-Aufreinigung über Säulen beruht dabei auf einem Anionenaustausch, der zu einer Bindung der negativ geladenen Plasmid-DNA an die positiv geladene Säulenmembran führt. Die Puffer und Inkubationsschritte sind ähnlich denen der „Maxi“ Plasmidpräparation und werden dort näher beschrieben.

„Maxi“ Plasmidpräparation

| | |
|------------------------------------|---|
| Puffer P1 (Resuspensionspuffer) | 50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A |
| Puffer P2 (Lysispuffer) | 200 mM NaOH; 1% SDS |
| Puffer P3 (Renaturierungspuffer) | 3,0 M NH ₄ OAc |
| Puffer QBT (Equilibrierungspuffer) | 750 mM NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15% Ethanol; 0,15% Triton X-100 |
| Puffer QC (Waschpuffer) | 1,0 M NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15% Ethanol |
| Puffer QF (Elutionspuffer) | 1,25 M NaCl; 50 mM Tris/HCl (pH 8,5); 15% Ethanol |
| QX-500 Säulen | |

Die zu präparierenden Bakterienklone werden in 500 ml LB-Medium in einer Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (10 Minuten, 5000 UpM) werden die Kulturen nach den Angaben des Herstellers Qiagen aufgearbeitet. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt bei dieser Methode durch die Bindung der DNA an eine Anionenaustauscher-Säule basierend auf SiO₂. Nach dem Entfernen von Verunreinigungen durch Waschschrte wird die DNA mit einem Hochsalzpuffer von der Säule eluiert, mit Isopropanol präzipitiert und mit 70% Ethanol entsalzt.

Präparation von Cosmid- und BAC-DNA

| | |
|------------------------------------|---|
| Puffer P1 (Resuspensionspuffer) | 50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A |
| Puffer P2 (Lysispuffer) | 200 mM NaOH; 1% SDS |
| Puffer P3 (Renaturierungspuffer) | 3,0 M NH ₄ OAc |
| Puffer QBT (Equilibrierungspuffer) | 750 mM NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15% Ethanol; 0,15% Triton X-100 |
| Puffer QC (Waschpuffer) | 1,0 M NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15% Ethanol |
| Puffer QF (Elutionspuffer) | 1,25 M NaCl; 50 mM Tris/HCl (pH 8,5); 15% Ethanol |
| QX-100 Säulen | |

100 ml LB-Medium werden mit 15 µl einer Glycerinkultur beimpft, das entsprechende Antibiotikum zugegeben und der Ansatz bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Nachdem bei 4 °C und 6000 UpM für 15 min zentrifugiert wurde, wird das Pellet mit 25 ml P1 für 20 min bei RT resuspendiert. Nach Zugabe von 25 ml P2 wird höchstens 5 min inkubiert. Während der Inkubation erfolgt eine Durchmischung durch vorsichtiges Schwenken. Nach Zugabe von 25 ml P3 (RT) und vorsichtigem Umschwenken erfolgt eine 45minütige Inkubation auf Eis. Abschließend wird 40 min bei 4 °C/13000 UpM zentrifugiert.

Die Säulen werden mit 2 ml Equilibrierungspuffer equilibriert, die Faltenfilter befeuchtet und der klare Überstand nach der Zentrifugation über den Filter gegeben. Der Durchlauf wird anschließend erneut auf die Säule gegeben. Danach wird mit je 4 ml Waschpuffer dreimal gewaschen und abschließend zweimal mit je 3 ml, auf 50 °C vorgewärmten, Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wird mit 0,8 Vol. Isopropanol gefällt. Nach der Zentrifugation bei 4 °C/15000 UpM für 30 min wird mit 10 ml 70% Ethanol gewaschen. Es folgt erneut eine 20minütige Zentrifugation. Der entstandene Niederschlag wird 10 min an der Luft getrocknet und dann in 200 µl H₂O aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt am Fluorometer.

5.5.3 DNA-Rückgewinnung aus Gelen mittels „QIAquick“ Gel Extraktions Kit

Das Prinzip der Gel Extraktion beruht auf der DNA-Bindung an eine Silica-Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffern, während Verunreinigungen aus der Säule ausgewaschen werden. Die zu isolierende DNA-Bande wird aus einem Agarosegel ausgeschnitten und nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen über eine Säule gereinigt. Anschließend wird die gereinigte DNA mit TE oder H₂O eluiert.

5.5.4 Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen: Quick-HMW-DNA

„Modified Bradleys“ 10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 2 mM EDTA; 10 mM NaCl; 0,5% SDS; 1 mg/ml Proteinase K

Konfluent gewachsene Zellen einer mittleren Kulturplatte werden mit PBS gewaschen, gegebenenfalls mit einem entsprechenden Agens modifiziert und mit 1,5 ml der Proteinase K-Lösung versetzt. Nach Überführen der Lösung in 15 ml Falconröhrchen inkubiert man sie über Nacht bei 55 °C. Anschließend wird die DNA durch die Zugabe von 100% Ethanol mit 75 mM NaOAc ohne Schütteln 2-3 Stunden bei Raumtemperatur präzipitiert. Durch vorsichtiges Schwenken und einem anschließenden Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1800 UpM wird die DNA pelletiert. Danach erfolgen zwei Waschschrte, bei denen das DNA-Pellet mit 1 ml 70% Ethanol für 30 min stehengelassen und anschließend wie beim erstenmal abzentrifugiert wird. Nach dem zweiten Waschschrte lässt man das DNA-Pellet für 10 min bei Raumtemperatur trocknen und nimmt dann die DNA in 30-100 µl TE auf. Die Lösung wird noch einige Zeit bei 37 °C geschüttelt. Danach erfolgt eine Konzentrationsbestimmung am Fluorometer.

5.5.5 Isolierung von Kompetitor-DNA aus *E.coli*

200 ml LB-Medium werden mit *E.coli* (Stamm DH10B) angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien werden pelletiert und mit 20 ml Proteinase K-Lösung (0,1 mg/ml) versetzt. Nach mindestens 2ständiger Inkubation bei 56 °C wird die Suspension mit 40 ml EtOH/LiCl versetzt. Die Suspension muss dazu relativ klar sein. Die präzipitierte DNA wird mittels eines Glasstabes aufgespult und mit 20 ml 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wird die DNA in 20 ml TE bei Raumtemperatur gelöst und in einem Ultraschallgerät sonifiziert (Einstellungen: 0,7 s Intervall, 86 Watt, 3-5 Minuten). Um Restprotein zu entfernen, wird die

DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen an Phenol und zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gewaschen. Die wässrige Lösung wird gegen 1xTE mehrfach bei RT und schließlich bei 4 °C über Nacht dialysiert. Abschließend wird die DNA-Konzentration gemessen (Konzentration ~1 µg/µl) und die Fragmentgröße auf einem Agarosegel überprüft. Die Größe der Kompetitor-DNA sollte zwischen 200-2000 bp liegen.

5.5.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

| | |
|----------------|---|
| TEN | 40 mM Tris/HCl (pH 8); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA |
| Trizol-Reagenz | (Total RNA Isolation Reagent); Gibco BRL |

Mindestens 1×10^6 Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und in TEN geerntet. Nach dem Zentrifugieren (5 min, 1000 UpM) kann das Pellet bei -70 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden. Das Zellpellet wird mit 1 ml TRIZOL resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform mischt man kurz und lässt den Ansatz für 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Zur Phasentrennung wird für 15 Minuten bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert. Die obere klare wässrige Phase wird vorsichtig abgezogen. 500 µl Überstand werden mit 500 µl Isopropanol gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wird 10 min zentrifugiert (s.o.), der Überstand wird vorsichtig abgezogen und die RNA, die als gelartiges Pellet erkennbar wird, mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen. Nun folgt ein 5minütiger Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 7500 x g. Das Ethanol wird vorsichtig entfernt, die RNA 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen.

5.6 DNA-Modifizierung

5.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Ein mithilfe der analytischen oder präparativen Plasmidpräparation isoliertes Plasmid kann durch die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen charakterisiert oder verändert werden. Für die enzymatische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen werden die von den Herstellern der einzelnen Enzyme angegebenen Reaktionsbedingungen angewendet. Die Restriktionspuffer, deren genaue Zusammensetzung den Beipackzetteln der jeweiligen Enzyme zu entnehmen ist, werden als 10fach konzentrierte Stammlösungen bei -20 °C gelagert. Die DNA in einer Konzentration von bis zu 1 µg/µl wird in dem vom Hersteller angegebenen Puffer bei der angegebenen Temperatur (zumeist 37 °C) gespalten. Zur Spaltung der Plasmid-DNA wird die 1-4fache Menge an Enzymeinheiten (Units) eingesetzt. Die Zugabe des Enzyms sollte 10 % des gesamten Volumens nicht überschreiten, da ansonsten Sternaktivitäten auftreten können. Die gespaltenen Fragmente können weiterhin für Klonierungen, Transfektionen oder radioaktive Markierungen eingesetzt werden.

5.6.2 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden

In den Fällen, in denen Plasmidvektoren und DNA-Fragmente mit verschiedenen Enzymen verdaut wurden, müssen die unterschiedlichen 5' kohäsiven Enden mit Klenow Enzym aufgefüllt werden, um glatte Enden zu erzeugen. Die Klenow-Auffüllreaktion kann auch für eine radioaktive Markierung von Plasmid-DNA genutzt werden.

| | |
|-------------------|--|
| 10x Klenow-Puffer | 100 mM Tris/HCl (pH 8); 500 mM NaCl; 100 mM MgCl ₂ ; 2 mM DTT |
| dNTP-Mix | dATP; dCTP; dTTP; dGTP je 3 mM in Wasser |

In einem Reaktionsansatz von 30 µl werden bis zu 1 µg gespaltene DNA mit 2 µl Nukleotid-Mix und 1-2 U des Klenow-Enzyms in 1x Klenow-Puffer bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1,5 µl 0,2 mM EDTA und Inkubation bei 65 °C (5 min) gestoppt.

5.6.3 Dephosphorylierung

Zur radioaktiven Markierung des 5'-Endes eines Fragments oder um bei einer Ligation eine Selbstligation zu verhindern, werden überstehende 5'- oder 3'-Enden der DNA-Fragmente mit alkalischer Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase = CIP) dephosphoryliert.

| | |
|-------------------------|--|
| 10x Phosphatase-Puffer: | 500 mM Tris/HCl (pH9); 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM ZnCl ₂ ; 1 mM Spermidin |
|-------------------------|--|

In einem Reaktionsansatz von 20 µl Endvolumen werden 2 µl 10x Phosphatase-Puffer und 2-10 pmol überstehende Enden mit 1 U Phosphatase 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 U Enzym wird für weitere 30 min inkubiert und die Reaktion anschließend durch Hitzeinaktivierung gestoppt.

5.6.4 T4-Kinase Reaktion

Die T4-Kinase phosphoryliert Nukleinsäuren an der freien 5'-OH-Gruppe der Desoxyribose. Diese Reaktion kann zur radioaktiven Markierung benutzt werden und ist Voraussetzung für die Oligomerisierung von PCR Fragmenten bei nicht phosphorylierten Primern.

| | |
|-----------------------------------|--|
| 10 x Polynukleotid-Kinase-Puffer: | 50 mM Tris/HCl (pH 7,6); 0,1 M MgCl ₂ ; 10 mM EDTA; 50 mM DTT |
|-----------------------------------|--|

1-40 pmol dephosphorylierte DNA wird mit 1 µl 10 x Kinase-Puffer, 0,3 µl 100 mM DTT, 3,3 µl 3 mM ATP und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (5 U) versetzt. Die Reaktion wird in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Nach einer 30minütigen Inkubationszeit wird die Reaktion durch eine 5minütige Inkubation bei 65 °C gestoppt.

5.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation verknüpft die T4-DNA-Ligase DNA-Fragmente, die sowohl kompatible, überstehende, als auch glatte Enden besitzen. Dabei erfolgt eine Phosphodiester-Bindung zwischen den 3'-OH- und den 5'-Phosphatenden der DNA.

| | |
|--------------------|--|
| 5 x Ligase-Puffer: | 250 mM Tris/HCl (pH 7,6); 50 mM MgCl ₂ ; 5 mM DTT; 25% (w/v) PEG 8000; 5 mM ATP |
|--------------------|--|

Für die Ligation überstehender, kompatibler Enden werden in einem 20 µl Ansatz 0,1-0,2 pmol eines gegebenenfalls zuvor dephosphorylierten Vektors mit 0,2-0,4 pmol eines DNA-Fragments, 4 µl 5x Ligase-Puffer und 2 U T4-DNA-Ligase eingesetzt. Inkubiert wird bei 16 °C über Nacht. Überstehende, komplementäre Enden werden relativ schnell und vollständig

verknüpft, glatte 3'- und 5'-Enden erfordern eine höhere Enzym- und DNA-Fragmentkonzentration. Bei der Ligation mit synthetischen Oligonukleotiden wird mit der 1000fachen molaren Menge des Fragments ligiert.

5.6.6 DNA-Oligomerisierung

Für eine Oligomerisierung von DNA-Fragmenten werden diese in einem zusätzlichen Ligationsschritt ohne Plasmid präligiert. Handelt es sich bei den eingesetzten Fragmenten um PCR-Produkte, müssen diese in den meisten Fällen über T4-Kinase an der freien 5'-OH-Gruppe phosphoryliert werden. Der 10 µl Kinasierungsansatz wird dazu mit 1,6 µl H₂O, 1,4 µl 10x Ligase-Puffer und 1 µl T4 Ligase versetzt. Inkubiert wird bei 16 °C über Nacht.

5.6.7 Klonierungen mit dem Zero Blunt® PCR Cloning Kit

Das Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Invitrogen) wird benutzt, um PCR-Fragmente (in unserem Fall oligomerisierte Fragmente) mit glatten Enden (*blunt end*) zu klonieren. Der PCR®-Blunt Vektor ermöglicht die direkte Selektion auf rekombinante Klone über die Unterbrechung eines Letalitäts-Genes (*cccdB*). Religationsereignisse führen zur Transkription des Genes und damit zu einem Absterben der Klone. Für einen Ligationsansatz werden 25 ng Vektor, 1-5 µl PCR-Produkt oder Präligationsansatz (s. 5.6.6), 1 µl 10x Ligations-Puffer (mit ATP) und 4 U/µl T4 DNA Ligase eingesetzt. Ligiert wird bei 16 °C über Nacht.

5.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)

5.7.1 DNA-Amplifikation durch PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine einfache, aber effiziente Methode zur Amplifikation eines bestimmten DNA-Segments *in vitro* aus einem Gemisch unterschiedlichster DNA-Sequenzen (z.B. Plasmide, genomische DNA, cDNA-Präparationen). Dazu muss lediglich die Sequenz der Grenzen des Segments zum Design geeigneter Oligonukleotidprimer bekannt sein.

Ein PCR-Zyklus besteht aus einer Reihe von aufeinanderfolgenden Inkubationsschritten bei unterschiedlichen Temperaturen: (a) die doppelsträngige DNA wird zunächst bei einer hohen Temperatur denaturiert, (b) danach erfolgt bei einer niedrigen Temperatur die Bindung der Primer, die komplementär zu den jeweiligen 3'-Grenzen des Zielsegmentes sind, (c) schließlich werden diese durch eine DNA-Polymerase bei einer intermediären Temperatur verlängert. Ein typisches Temperaturprofil sieht wie folgt aus:

- (a) *Denaturation* 95°C (0.5-1 min)
- (b) *Annealing* 45-65°C (0.5-1 min)
- (c) *Extension* 72-74°C (1 min pro kb)

Die Verwendung von thermostabilen Polymerasen erlaubt die häufige Wiederholung dieses Zyklus ohne erneute Zugabe des Enzyms. In den meisten Fällen wird die sogenannte Taq-Polymerase von *Thermophilus aquaticus* verwendet. Um Ablesefehler in der Sequenz des Amplifikats zu reduzieren, können sogenannte Polymerasen mit *proof reading* Aktivität eingesetzt werden. Solche Enzyme besitzen sowohl eine 5'-3' Polymerase- als auch eine 3'-5' *proof reading* Exonuklease-Aktivität, was zu einer um 1/10 verringerten Fehlerrate führt. Die in dieser Arbeit eingesetzten *proof reading* Enzyme sind Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*

und Vent-Polymerase aus *Thermococcus litoralis*. Die resultierenden Amplifikationsprodukte besitzen keine A-Überhänge, wie sie die Taq Polymerase produziert, sondern sind *blunt end*.

Da während der PCR theoretisch bei jedem Zyklus nur die betreffende Sequenz verdoppelt wird, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg ihrer Konzentration, so dass am Ende eine bis zu 10^9 -fache Vermehrung des gewünschten Segmentes erreicht werden kann. Ein typischer Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 μ l besteht aus folgenden Komponenten:

1. 5 μ l 10x PCR-Puffer
2. 200 μ M dNTP-Mix
3. 0,1-0,5 μ M Primer-Mix
4. 2 U Taq-Polymerase
5. ad 50 μ l mit aq. bidest

Die einzelsträngigen Oligonukleotid-Primer sollten 15-30 bp lang sein und besonders an ihrem 3'-Ende keine Komplementarität zu sich selbst oder zueinander aufweisen. Für eine maximale Spezifität sollte der GC-Gehalt bei etwa 50% liegen. Die Konzentration an Primern kann in dem angegebenen Bereich variieren; entscheidend ist, dass beide Primer in äquimolarem Verhältnis vorliegen.

5.7.2 *Light-Cycler Real Time RT-PCR*

Die Reverse Transkription von RNA, gefolgt von einer *Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), ist eine extrem sensitive Methode, um spezifische mRNAs zu detektieren und zu quantifizieren. Aus Geweben oder Zellen isolierte RNA wird im ersten Schritt als Template für die Reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) mittels AMV-Reverse-Transkriptase (Avian Myeloblastosis Virus) eingesetzt. Die cDNA wird wiederum als Template für die folgende PCR verwendet, die mit spezifischen Primern arbeitet, um eine bestimmte cDNA-Region zu amplifizieren. Um bessere quantitative Aussagen über eingesetzte mRNA Mengen machen zu können, kommen *Real-Time* RCR-Maschinen wie der *LightCycler* von Roche zum Einsatz. Über eine Fluorimeter-Komponente erfasst der *LightCycler* die Bindung von Fluorophoren wie *SYBR Green* an doppelsträngige DNA. Die Fluoreszenz von *SYBR Green* wird verstärkt, wenn das Molekül an die kleine Furche der DNA bindet. Diese Bindung erfolgt sequenzunabhängig.

Bei dem *LightCycler* RNA Amplifikationssystem *SYBR Green I* von Roche handelt es sich um ein 1-Schritt System mit Reverser Transkriptase und Taq-Polymerase als Enzymgemisch. Ein typischer Ansatz mit diesem System sieht folgendermaßen aus:

- 8 μ l H₂O
- 4 μ l Reaction Mix SYBR Green I
- 2 μ l Resolution Solution
- 1,6 μ l MgCl₂ (4 mM)
- 2 μ l Primer Mix (0.5 mM)
- 0,4 μ l Enzym Mix
- 2 μ l Gesamt-RNA (1 pg- 1 μ g)

Nach einem 20minütigen RT-Schritt bei 55 °C wird ein PCR nach herkömmlichem Schema durchgeführt:

- (1) 95 °C - 5 s
- (2) 55-65 °C - 10 s
- (3) 72 °C - 25 s (Produktlänge [bp]/25)

Die Produktbildung wird nach jedem Replikationszyklus über den Fluoreszenzanstieg bestimmt. Nach im Durchschnitt 50 Replikationszyklen werden die Schmelzkurven der

gebildeten Produkte erfasst, um so die Spezifität der PCR-Reaktion überprüfen. Aufgrund des Schmelzverhaltens von DNA nimmt die Fluoreszenz mit steigender Temperatur ab. Die maximale Fluoreszenzänderung pro Temperaturerhöhung ergibt ein Maximum in der Schmelzkurve, welches charakteristisch für jedes PCR-Produkt ist.

5.7.3 Sequenzierung von DNA

Die enzymatische Sequenzierreaktion nach Sanger et al. (1977) beruht auf einem nukleotidspezifischem Kettenabbruch durch den Einbau eines Didesoxy-Nucleotids.

| | |
|--------------------------------|---|
| Reaktionspuffer | 260 mM Tris/HCl (pH 9,5); 65 mM MgCl ₂ |
| ThermoSequenase DNA Polymerase | 4 U/μl |
| ddATP Terminationsmix | 150 μM dATP; dCTP; 7-deaza-dGTP; dTTP; 1,5 μM ddATP |
| ddCTP Terminationsmix | 150 μM dATP; dCTP; 7-deaza-dGTP; dTTP; 1,5 μM ddCTP |
| ddGTP Terminationsmix: | 150 μM dATP; dCTP; 7-deaza-dGTP; dTTP; 1,5 μM ddGTP |
| ddTTP Terminationsmix: | 150 μM dATP; dCTP; 7-deaza-dGTP; dTTP; 1,5 μM ddTTP |
| Stoppuffer: | 95% Formamid; 20 mM EDTA; 0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylencyanol |

2,5 μg Plasmid-DNA, 2 μl Reaktionspuffer, 1 μl Primer (Fluorescein-markiert, 1 pmol/μl) und 0,25 μl Sequenase werden mit H₂O auf 17,5 μl aufgefüllt. 4 μl des DNA-Mixes werden zu je 4 μl Nukleotidmix pipettiert. Im Gegensatz zum klassischen Sequenzierverfahren nutzt man beim *Cyclesequencing* die Vorteile der PCR. Durch das Durchlaufen mehrerer Zyklen von Denaturieren, Annealing und Elongation wird die Sensitivität erhöht. Das verwendete PCR-Programm lautet wie folgt:

| | | |
|-----|---------------|--|
| (1) | 95 °C - 3 min | } die Schritte 2 bis 4 werden 29x wiederholt |
| (2) | 95 °C - 30 s | |
| (3) | 50 °C - 30 s | |
| (4) | 72 °C - 1 min | |

Nach Ablauf des Programms wird die Reaktion durch Zugabe von 2 μl Stoppuffer beendet. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wird die DNA für 3 min bei 95°C denaturiert und dann sofort auf Eis abgekühlt. Es werden 2 μl des Reaktionsansatzes auf einem denaturierenden Sequenziergel getrennt (s. 5.8.2) und die Proben abschließend über BaseImageIR (LI-COR) ausgewertet.

5.8 Gelelektrophoresen

5.8.1 Agarose Gelelektrophorese

| | |
|-------------------|---|
| Laufpuffer (TAE): | 40 mM Tris/Acetate (pH 7,5); 20 mM NaOAc; 1 mM EDTA |
| 5x Ladepuffer: | 15% Ficoll; 50 mM EDTA; 1x TAE; 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol |
| 6x Ladepuffer | 25% Ficoll; Orange G-Indikator (einige mg) |

Zur Anfertigung eines 1%igen Standardgels wird 1g Agarose in 100 ml Laufpuffer in der Mikrowelle gelöst. Die flüssige Agarose wird mit 3 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) vermischt und in eine Gelkammer gegossen. Zur Formung der Geltaschen wird ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren wird das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit der entsprechenden Menge an Ladepuffer versetzt. Für die Größenzuordnung eines Fragments werden Größenstandards parallel mit aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei ca. 100 V und 30 mA durchgeführt. Je nach Größe der Fragmente werden die DNA-Banden nach 1-3-stündiger Elektrophorese auf dem Transilluminator unter UV-Licht (360 nm) fotografiert. Für die präparative Gewinnung der DNA-Fragmente werden die Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

5.8.2 Sequenziergele

10x TBE Laufpuffer 100 mM Tris/Borat (pH 8,3); 2,5 mM EDTA

Sequenziergel 25,5 g Harnstoff
 7,2 ml 50% Long Ranger Gel Solution (BMA)
 7,2 ml 10x TBE
 ad 60 ml mit H₂O
 => 400 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS)
 => 40 µl Temed

Die Sequenziergel-Glasplatten werden vor jedem Gebrauch sorgfältig mit einem fettlösenden Geschirrspülmittel und Ethanol gereinigt. Für das Gel wird die oben beschriebene Lösung angesetzt, etwas erwärmt und wieder auf RT abgekühlt. Nach dem Lösen des Harnstoffs wird das Ganze filtriert und dabei entgast. Mit 40 µl TEMED und 400 µl 10%igem APS wird die Polymerisation gestartet. Die Lösung wird zwischen die zusammengesetzten, waagrecht auf einer Unterlage liegenden Glasplatten pipettiert und das Gel polymerisiert für ca. 2 h. Vor dem Beladen des Gels muss dieses ca. 60 min vorlaufen, der eigentliche Lauf dauert mehrere Stunden. Die spezifischen Laufparameter werden automatisch je nach Gel über das Programm *Quick Sequence IR* (LI-COR) geladen.

5.9 Radioaktive Nachweismethoden

5.9.1 DNA-Markierung mit dem „Rediprime DNA Labelling System“

Labelling Mix (Amersham Life Science) dATP; dGTP; dTTP; exonucleasefreies Klenow-Enzym; Oligonukleotidprimer (9mer)

25-50 ng DNA werden in einem Endvolumen von 45 µl in einem Eppendorfgefäß für 5 Minuten bei 100 °C denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt. Anschließend wird der Ansatz in den Labelling Mix pipettiert, gemischt und nach Zugabe von 5 µl α[³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) für ca. 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die nicht eingebauten Nukleotide werden über eine Sephadex-Säule abgetrennt.

5.9.2 Klenow-Markierung von 5'-überhängenden DNA-Enden

Das Prinzip der Klenow-Markierung ist detailliert unter 5.6.2 beschrieben. Für die radioaktive 5'-Endmarkierung von DNA-Sonden werden anstelle von dATP 2 µl radioaktiv markiertes [³⁵S]dATP (>1000 Ci/mmol) eingesetzt. Die nicht inkorporierten Nukleotide werden nach Beendigung der Reaktion über eine Sephadex G50 Säule entfernt. Bei der [³⁵S]-Markierung von Lambda-DNA als Größenstandard wird das Reaktionsvolumen aufgrund der DNA-Menge (10 µg DNA in einem 100 µl Eco RI/Hind III Verdau) vervierfacht.

5.9.3 Southern Blotting

2-10 µg der aufgereinigten, hochmolekularen DNA werden mit 2 µl des jeweiligen 10fachen Restriktionspuffers, 0,5 µl TE/RNase (10 µg/ml) sowie 20 U des Restriktionsenzym versetzt und über Nacht im Gesamtvolumen von 20 µl bei spezifischer Enzymtemperatur inkubiert. Die verdaut DNA wird mit 5 µl Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch in einem 0,8-2,0%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt; als Größenstandard wird [³⁵S]-markierte Lambda-DNA verwendet.

Der Transfer der DNA vom Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B Transfer Membrane, Fa. Pall) erfolgt mit 0,4 M NaOH. Lange DNA-Fragmente (>5 kb) können vor dem Transfer mittels 0,25 M HCl (ca. 30 Minuten) depuriniert werden, so dass sie während des alkalischen Transfers in Teilfragmente zerfallen und leichter aus dem Gel austreten können. Das Gel wird anschließend mit 0,4 M NaOH neutralisiert und in eine Blotapparatur überführt: das Gel liegt mit der Unterseite nach oben oberhalb des Flüssigkeitsspiegels auf einem feuchten, exakt auf Gelbreite zugeschnittenen Filterpapierstreifen (Whatman 3MM), dessen gegenüberliegende Ränder in das Pufferreservoir (0,4 M NaOH) eintauchen. Unter dem Filterpapier sollten ein Schwammtuch oder mehrere Lagen Filterpapier liegen, die nicht mit der Flüssigkeit in Berührung stehen. Auf das Gel wird die Nylonfolie gelegt, die zuvor in NaOH gewässert wurde. Luftblasen zwischen Gel und Membran sind sorgfältig zu entfernen. Auf die Membran werden zwei Lagen mit 0,4 N NaOH angefeuchtetes und 5 Lagen trockenes Filterpapier geschichtet. Nach oben schließt ein Stapel saugfähiges Papier (z.B. *Tork*) die Anordnung ab. Die Apparatur wird vorsichtig mit einem Gewicht (ca. 500 g) beschwert. Der Transfer sollte mindestens 6 Stunden, meist jedoch über Nacht erfolgen. Bei einem Durchfeuchten sollte der Papierstapel gewechselt werden. Anschließend wird die Nylonfolie in 2x SSC neutralisiert und 30 min bei 65 °C gebacken. Nach dem Backen kann die Membran zur Hybridisierung eingesetzt werden.

Hybridisierung und Waschen

| | |
|-----------------------|--|
| Hybridisierungslösung | 0,5M Na _x H _x PO ₄ (pH 7,2); 7 % SDS; 2 mM EDTA |
| Waschlösung I | 40mM Na _x H _x PO ₄ (pH 7,2); 1 % SDS; 2 mM EDTA |
| Waschlösung II | 40mM Na _x H _x PO ₄ (pH 7,2); 0,1 % SDS; 2 mM EDTA |
| Waschlösung III | 100 mM Na _x H _x PO ₄ (pH 7,2); 2 mM EDTA |

6 ml der Hybridisierungslösung (nach Church et al. 1989) werden in ein Glasröhrchen gefüllt und die Membran mit der DNA-freien Seite an die Glaswand eingelegt. Die Prähybridisierung erfolgt bei 68°C im Hybridisierungssofen für ca. 30 Minuten. Die denaturierte, radioaktiv markierte Probe wird hinzugefügt und die Hybridisierung erfolgt bei gleichen Bedingungen über Nacht. Die Oberfläche der Membran darf durch zu grobe Handhabung nicht verletzt werden; auch sollten sich zwischen Membranrückseite und Glaswand keine Luftblasen befinden.

Der erste Waschschrift erfolgt im Hybridisierungsröhrchen. Danach wird die Membran vorsichtig entnommen, die folgenden Waschschriftte erfolgen im Wasserbad bei 68 °C.

2x 5 Minuten mit Waschlösung I

1x 5 Minuten mit Waschlösung II

3x 5 Minuten mit Waschlösung III zur Entfernung von SDS-Resten

Anschließend kann die Membran feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert werden. Ein Trocknen der Membran führt zu irreversibler Bindung und macht nachträgliches Waschen und Rehybridisieren unmöglich. Zur Rehybridisierung einer Membran wird die Aktivität durch mehrfaches Waschen in 0,1% SSC / 0,1% SDS bei 95°C entfernt. Die vollständige Ablösung der radioaktiven Probe wird durch eine anschließende Exposition sichergestellt. Eine erneute Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgt wie gehabt.

5.10 Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen

5.10.1 Medien und Lösungen

| | |
|---|--|
| PBS | 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O; 1,47 mM KH ₂ PO ₄ (pH 6,8-7,0) mit 1 N NaOH einstellen; bei 4 °C lagern |
| TEP | 0,1-0,2% Trypsin-EDTA (Fa. Gibco) in PBS |
| Penicillin/Streptomycinlösung (100x) | 1,212 g Ampicillin / 200 ml (10000 U/ml); 2 g Streptomycin / 200 ml (10 mg/ml); zum Lösen mit NaOH auf pH 7,4 einstellen; bei -20 °C lagern |
| Glutaminlösung (100x) | 29,23 g Glutamin in 1 l lösen; bei -20 °C lagern |
| DME-Medium (Dulbecco's Modification of Eagles Medium) | |

Man füllt Milliporewasser in 10 l Steilbrustflaschen, gibt die erforderliche Menge Pulvermedium (DME-Pulver von Fa. Flow) dazu und rührt mit einem Rührkern, bis das Medium vollständig gelöst ist. Nach Zugabe von 1/100 Volumen 1 M HEPES und 3,75 g/l NaHCO₃ wird das Medium in sterile Flaschen filtriert. Die Flaschen werden zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert, um eventuelle Kontaminationen zu erkennen, und anschließend bei 4 °C gelagert. Wenn nicht anders beschrieben, wird dem Medium kurz vor Gebrauch 10% FCS, 1/100 Volumen Glutaminlösung sowie 1/100 Volumen Penicillin/Streptomycinlösung zugesetzt.

5.10.2 Kultivierung von Zelllinien

Die Zellen werden bei 37 °C und 5% CO₂ in einem nassbegasten Brutschrank kultiviert. Für die verwendeten Zelltypen wird DME-Medium mit 10% FCS, 20 mM Glutamin, 60 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Je nach Zelldichte sollte alle 2 bis 5 Tage das Medium gewechselt werden. Sind die Zellen konfluent, werden sie umgesetzt (passagiert).

5.10.3 Passagieren

Die zu passagierenden Zellen werden vom Medium befreit und mit PBS gewaschen. Das PBS wird abgesaugt und die Zellen mit einem dünnen Film TEP überschichtet. Nach einigen Minuten lösen sich die Zellen von der Oberfläche. Die Zellsuspension wird zur Inaktivierung des Trypsins in mindestens der doppelten Menge serumhaltigen Mediums aufgenommen. Noch lose, auf dem Boden des Kulturgefäßes haftende, Zellen werden mit Hilfe einer Pipette abgespült. Gegebenenfalls wird ein Aliquot der Zellsuspension gezählt und die Zellen in der gewünschten Konzentration in einem neuen Kulturgefäß mit frischem Medium ausgesät.

5.10.4 Langzeitlagerung von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen einer kleinen Flasche (ca. 3×10^6 Zellen) werden mit PBS gewaschen und mit 1 ml TEP abgelöst. Man nimmt die Zellsuspension in 4 ml Medium auf und zentrifugiert 5 min bei 1000 UpM. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen werden in 2 ml kaltem FCS mit 5% DMSO aufgenommen und auf 3-4 Einfrierröhrchen (Bio-Freeze-Vials, Fa. Costar) aliquotiert und sofort auf Eis gestellt. Man belässt die Röhrchen maximal 60 min auf Eis, verpackt sie in Zellstoff und lagert sie in Styroporkästen bei -70°C . Nach ca. 12 h können sie in flüssigen Stickstoff überführt werden. Das Auftauen der Zellen sollte möglichst schnell erfolgen. Dazu erwärmt man die Röhrchen im 37°C Wasserbad und nimmt die Zellsuspension in 10 ml Medium auf, um das DMSO zu verdünnen. Die Zellsuspension wird 5 min bei 1000 UpM zentrifugiert, das Zellpellet in 5 ml frischem Medium aufgenommen und in eine kleine Flasche überführt.

5.10.5 Transfektion von Säugerzellen

5.10.5.1 Transfektion von Säugerzellen mittels Calciumphosphat-DNA-Copräzipitation

Die Transfektion ist eine Methode zum Einbringen von Fremd-DNA in kultivierte Säugerzellen. Die Calciumphosphat-Methode eignet sich besonders für adhärente Zellen. Sie wird überwiegend für den stabilen DNA-Transfer in das zelluläre Genom eingesetzt, eignet sich jedoch auch für die transiente Expression der DNA. Die Plasmid-DNA wird als Calciumphosphatpräzipitat von den eukaryontischen Zellen phagozytiert und gelangt ins Cytoplasma der Zellen. Bei einer Selektion auf Resistenzgene erfolgt eine stabile Integration der transfizierten DNA.

2 x HEBS (pH 7,1)

280 mM NaCl; 50 mM HEPES; 1,5 mM Na_2HPO_4

Zellen, die für eine Transfektion ausgesät werden (2×10^5 Zellen pro 28 cm^2) sollten sich unbedingt in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Werden konfluente Zellen eingesetzt, gelingt der DNA-Transfer oft nur sehr schlecht. Vier Stunden vor der Transfektion wird ein Medienwechsel mit DME-Medium durchgeführt. Für den Transfektionsansatz werden in einem ersten Röhrchen 250 μl 2x konzentrierter HEBS-Puffers vorgelegt (Gesamtvolumen je Präzipitat bei 28 cm^2 -Gefäßen beträgt 500 μl). In ein zweites Röhrchen pipettiert man 25 μl 2,5 M CaCl_2 sowie die DNA (1-5 μg der zu transfizierenden DNA zusammen mit 0,5 μg Selektions-DNA und 5 μg hochmolekularer DNA als Carrier), füllt bis zum Endvolumen von 250 μl mit Wasser auf und tropft das CaCl_2 -DNA-Gemisch unter Aufwirbeln des HEBS (Vortexen) in den Transfektionspuffer. Nach 5 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur hat sich das Präzipitat gebildet und wird auf die Zellen gegeben. Überschüssiges Präzipitat wird nach mindestens vier Stunden, spätestens nach einer Nacht von den Zellen entfernt (Medienwechsel). Für eine Zelldichte von 5×10^5 Zellen pro 55 cm^2 Platte muss die DNA-Menge und das Präzipitationsvolumen erhöht werden. In diesem Fall beträgt das Volumen 1 ml. Nach 24 h werden die Zellen unter Selektionsbedingungen gehalten.

5.10.5.2 Transfektion von Säugerzellen mittels Elektroporation

Je nach Elektroporationsansatz wird das zu transfizierende Plasmid linearisiert oder gegebenenfalls zirkulär verwendet. Logarithmisch wachsende, halbkonfluente Zellen werden mit TEP abgelöst, gezählt und in serumfreiem Medium in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen pro 700 μl aufgenommen. Die 700 μl Zellsuspension werden in ein steriles Röhrchen gegeben

und mit der zu transfizierenden Menge an Plasmid (2-5 µg) vermischt. Anschließend wird der Ansatz in eine 0,4 cm sterile Plastikkuvette pipettiert, die Kuvette in die Elektroporationskammer gestellt und die vorher ausgetestete, optimale Spannung und Stromstärke angelegt. Die normalen Bedingungen für NIH-3T3-Zellen sind 500 µF und 250 V/cm. Die behandelten Zellen werden umgehend mit Kulturmedium verdünnt (1/10-1/20) und ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgt der erste Medienwechsel und gegebenenfalls dann oder nach 48 Stunden die Zugabe des Selektionsmediums.

5.10.6 Durchführung einer Selektion

In der Regel wird das Medium einen Tag nach der Transfektion gewechselt. Am nächsten Tag werden die Zellen optional umgesetzt (mindestens eins zu drei verdünnt) und mit Selektionsmedium versetzt, das alle 2-3 Tage erneuert wird. Klone erscheinen je nach Selektion und Zelltyp 8-21 Tage später. Die Klone werden, wenn sie Stecknadelkopfgröße erreicht haben, auf der Plattenrückseite mit Hilfe eines Filzstifts markiert, gezählt und die Zählung unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend können Klone isoliert, als Klongemisch weiterverwendet oder subkloniert werden. Die zur Selektion verwendeten Drogenkonzentrationen sind vom Zelltyp abhängig und müssen vorher ausgetestet werden. Für eine Neomycin (G418)-Selektion typische Konzentrationen sind:

| | |
|---------------------------|----------------|
| NIH-3T3-Zellen: | 800 µg/ml G418 |
| Ltk ⁻ -Zellen: | 700 µg/ml G418 |

5.10.7 Der Interferon-Test

Induktion mit Sendai-Virus

Nachdem die Zellen zu 2/3 konfluent gewachsen sind, können diese mit Sendai-Virus infiziert und somit die Interferon Produktion induziert werden. Hierzu wird das Virus 1:40 in DME ohne FCS eingesetzt. Die zu infizierenden Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen, um das an den Zellen befindliche Serum zu entfernen. Das Infektionsmedium wird 1 h auf den Zellen belassen, die Kontrollzellen erhalten Medium ohne Viren. Die Virusinfektion wird durch zweimaliges Waschen mit DME/FCS gestoppt und der Interferontiter nach 24 h Inkubationszeit bestimmt.

Bestimmung des Interferon-Titers

Färbelösung: 50 g Kristallviolett; 8,5 g NaCl; 143 ml 37%iges Formaldehyd; 500 ml Ethanol; mit Wasser auf 1 l auffüllen

Vero- oder FS4-Zellen werden auf Microtiterplatten in DME-Medium in einer Konzentration von etwas 1000 Zellen/Loch ausgesät, so dass die Platten am nächsten Tag konfluent bewachsen sind. Die zu testenden Überstände und mehrere 1:1 Verdünnungsstufen werden in die oberste Reihe der Platte gegeben. In eine weitere Reihe wird das Medium mit einem Interferonstandard pipettiert (Konzentration 500 U/ml) und auch hier mehrere Verdünnungsstufen angelegt. Nach 24 h wird das Medium entfernt und je 100 µl einer Virussuspension (DME mit 5% FCS, 10⁴ pfu VSV) pro Loch der Microtiterplatte werden auf die Zellen gegeben. Die durch Virusinfektion ausgelöste Lysis kann nach weiteren 24 h unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Der Virusüberstand wird abgenommen und mit 2,5%igem Formaldehyd inaktiviert. Die durch Interferon geschützten, noch lebenden Zellen werden mit

der Kristallviolett-Färbelösung angefärbt und durch den Vergleich mit dem Interferonstandard wird der Interferontiter der Überstände bestimmt.

5.10.8 *Metaphasespreads*

Um Metaphasechromosomen aus Zellen zu isolieren, müssen sich die Zellen in einem aktiven Replikationszyklus befinden, d.h. sie dürfen nicht konfluent sein. Durch Zugabe von 0,04 µg Colcemid (Stocklösung 10 µg/ml) pro ml Kulturmedium 2-4 h vor der Zellernte kann der Anteil an sich in der Mitose befindenden Zellen erhöht werden. Colcemid wirkt als Spindelgift, das sich teilende Zellen in der Metaphase der Mitose arretiert. Nach bis zu 4 h Inkubationszeit werden die Zellen mit Trypsin geerntet, der alte Medienüberstand wird zum Abstoppen der Trypsinwirkung eingesetzt. Der Medienüberstand enthält möglicherweise mitotische Zellen, die sich aufgrund des größeren Zellvolumens von der Kulturschale abgelöst haben. Die Zellen werden auf vier 2 ml Eppendorfgefäße verteilt und bei 400xg pelletiert. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet in der Restflüssigkeit durch vortexen resuspendiert und anschließend 1,5 ml hypotonische Salzlösung zugegeben. Die Salzlösung besteht entweder aus 0,075 mM KCl oder einer Mischung aus 0.9% Natriumcitrat und KCl im Verhältnis 1:1 oder 1:20. Nach 1-5minütiger Inkubationszeit werden die Zellen bei 400 x g pelletiert und mit 1,5 ml kalter Methanol/Eisessig (3:1) Lösung 10-30 min auf Eis fixiert. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt, bevor die Zellen über Nacht im Kühlschrank fixiert werden. Am nächsten Tag werden die Zellen noch zweimal mit der Fixierungslösung gewaschen und anschließend 20 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger getropft. Die Objektträger sind vorgekühlt, die Tropfhöhe beträgt ca. 30 cm. Die getropften Präparate werden kurz durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen, getrocknet und die Qualität unter einem Lichtmikroskop bewertet.

5.11 Proteinanalytik

5.11.1 Nachweis für β -Galaktosidase

5.11.1.1 Färbung von Zellen

| | |
|--------------|---|
| PBS | pH 7,1 |
| Fixierlösung | 2% Formaldehyd; 0,1% Glutardaldehyd in PBS |
| Färbelösung | 5 mM $K_3Fe(CN)_6$; 5 mM $K_4Fe(CN)_6$; 2 mM $MgCl_2$; 100 µg/ml X-Gal |

Die Einzelkomponenten werden als 100x Stocklösungen in PBS angesetzt und bei 4 °C dunkel gelagert, bis auf X-GAL, welches in Dimethylformamid angesetzt und bei -20°C gelagert wird. Unmittelbar vor der Färbung werden die Einzelkomponenten in PBS verdünnt. Die Zellen werden zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Dann wird die Fixierlösung hinzugegeben, zwei Minuten inkubiert und zügig mit PBS gewaschen. Nach einem weiteren 10minütigen Waschschriff wird die Färbelösung auf die Zellen gegeben. Die Färbereaktion erfolgt in einem feuchten Schrank bei 37 °C für mindestens 30 Minuten. Nach ca. 10 Stunden tritt keine weitere Färbung mehr auf. Die Zellen werden unter dem Lichtmikroskop betrachtet, blau gefärbte Zellen exprimieren β -Galaktosidase.

5.11.1.2 β -Galaktosidase aus Zellextrakten

(MUG-Assay nach Kalos und Fournier 1995)

| | |
|----------------|---|
| Substratpuffer | 60 mM $Na_2H_2PO_4$, 40 mM Na_2HPO_4 , 10 mM HCl, 1 mM $MgSO_4$, 50 mM β -Mercaptoethanol |
|----------------|---|

MUG 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktosid), als Stock in Dimethylformamid bei -20°C gelagert

Nahezu konfluente Zellen einer 9,1 cm² Kulturfläche werden mit PBS gewaschen und mit 1 ml TEN geerntet. Nach dem Abzentrifugieren (5 Minuten, 1000 UpM) wird das Pellet in 200 μ l Tris/HCl (pH 7,8) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im 37 °C Wasserbad. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 4 °C und 13000 UpM pelletiert. Der Überstand wird für die Messungen eingesetzt. Dazu legt man je 20 μ l Überstand bzw. geeignete Verdünnungen in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte vor. Durch Zugabe von 200 μ l Substratpuffer, dem zuvor 30 μ g/ml MUG zugesetzt wurde, wird die Reaktion gestartet. Die Messung erfolgt im Fluoreszenz-ELISA-Reader (Anregung bei λ = 365 nm). Gemessen wird die Emission bei λ = 450 nm in 5minütigen Intervallen. Um unabhängige Messungen vergleichen zu können, ist es erforderlich, eine Eichkurve mit dem aufgereinigten β -Galaktosidase Enzym zu erstellen.

5.11.2 Nachweis von Luciferase

| | |
|-----------------------------|---|
| Luciferaseverdünnungspuffer | 0,5 M TRIS-Succinat (pH 7,7) |
| Reaktionspuffer | 25 mM Glycylglycin (pH 7,8); 5 mM ATP; 15 mM MgSO ₄ |
| Luziferinlösung | 0,2 mM Luziferin (D-Luziferin, synthetisch) in 25 mM Glycylglycin |

Die zu testenden Zellen lässt man in 6-Loch Platten konfluent wachsen. Nach Absaugen des Mediums werden die Zellen mit PBS gewaschen. Man gibt 1 ml TEN dazu, spült die Zellen mit einer Pipette ab und überführt die Suspension in ein Eppendorfhütchen. 50 μ l der Zellsuspension werden im Zellcounter vermessen. Die restlichen Zellen werden durch Zugabe von 100-200 μ l 250 mM Tris/HCl, dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen bei 37°C lysiert. Die Zelltrümmer werden 10 Minuten bei 4°C und 13000 UpM zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und vermessen. In den Messröhrchen werden 20 μ l Extrakt (u.U. auch mehr) zu je 350 μ l Reaktionspuffer gegeben und sofort im Counter gemessen (10 Sekunden Integral). Der Injektor des Counters wird vorher mit Luziferinlösung gespült; in den Reaktionen werden 100 μ l Luziferin-lösung/Probe benötigt. Die in 10 Sekunden gemessenen Lichtblitze werden auf die Zellzahl normiert.

5.12 Methoden zur Kernmatrixpräparation (*scaffold preparation*)

5.12.1 Die Lithium-3,5-diiodosalicylat(LIS)-Extraktionsmethode

Stocklösungen

| | |
|-------------------|--|
| Tris/HCl | 1 mol/l (pH 7,4) |
| MgCl ₂ | 1 mol/l |
| Li-acetat | 1 mol/l |
| NaCl | 1 mol/l |
| KCl | 1 mol/l |
| HEPES | 100 mmol/l (pH 7,4; mit NaOH einstellen) |
| EDTA | 0,5 mol/l (pH 8) |

| | |
|----------------------------|--|
| K-EDTA | 50 mmol/l (2,92 g freie Säure lösen, pH auf 7,4 mit KOH einstellen und auf 200 ml auffüllen) |
| Spermine-Tetrahydrochlorid | 0,5 mmol/l (in der Mikrowelle lösen) |
| Spermidine-Trihydrochlorid | 1,25 mmol/l |
| Digitonin | 1% (in der Mikrowelle lösen) |
| PMSF | 0,1 mol/l (in Isopropanol lösen) |

Puffer

| | |
|---------------------------|---|
| Isolierungspuffer | 3,75 mmol/l Tris-HCl (pH 7,4); 0,05 mmol/l Spermine; 0,125 mmol/l Spermidine; 0,5 mmol/l K-EDTA; 1% Thiodiglycol (frisch zugeben) |
| Kernstabilisierungspuffer | 20 ml 5 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4; 0,05 mmol/l Spermine; 0,125 mmol/l Spermidine; 20 mmol/l KCl, 1% Thiodiglycol |
| LIS-Puffer | 100 mmol/l Li-Acetat; 20 mmol/l HEPES (pH 7,4) 1 mmol/l EDTA |
| LIS-Lösung | 94 mg LIS in 1 ml 1% Digitonin lösen und 9 ml LIS-Puffer zugeben (25 mM) |
| Restriktionspuffer | 500 ml 20 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4; 0,05 mmol/l Spermine; 0,125 mmol/l Spermidine; 20 mmol/l KCl; 70 mmol/l NaCl; 10 mmol/l MgCl ₂ : steril filtrieren und bei 4 °C aufbewahren |
| Proteinase K-Puffer | 5% SDS; 50 mmol/l EDTA; 0,2 mol/l Tris HCl (pH 8,5) |

Isolierung von Zellkernen

Zellen, typischerweise Maus-2₄-Fibroblasten, werden auf großen Platten (12 cm Durchmesser) ausgesät. Für ein Experiment werden Zellkerne von 2 konfluent bewachsenen Platten (~5x10⁷ Zellen) geerntet. Soweit nicht anders erwähnt, werden die verwendeten Lösungen im Eisbad vorgekühlt. Die Digitonin-Lösung wird vor Gebrauch in der Mikrowelle aufgeköcht.

Die vom Medium befreiten Platten werden zweimal mit je 15 ml Isolierungspuffer (supplementiert mit 0,1% der PMSF-Stammlösung) gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 7,5 ml Isolierungspuffer + 0,1% Digitonin versetzt und von der Kulturschale abgeschabt. Die Zellsuspension von zwei großen Platten wird vereinigt und das Gesamtvolumen von 15 ml in einen Dounce-Homogenisator überführt. Durch 14maliges Auf- und Abbewegen eines S-Pistill (S: *strong*) werden die Zellkerne freigesetzt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 1000 x g und 4 °C wird das erhaltene Kernpellet mit 5 ml Isolierungspuffer + 0,1% Digitonin durch 4maliges Bearbeiten mit einem L-Pistill (L: *loose*) gewaschen.

LIS-Extraktion

Nach der Isolierung werden die Zellkerne in 200 µl Kernstabilisierungspuffer für 30 min bei 42 °C hitzestabilisiert. Anschließend werden die stabilisierten Kernpellets mit 4 ml LIS-Lösung (94 mg/10 ml ± 25 mM) extrahiert. Durch 4maliges bearbeiten mit dem L-Pistill werden die Zellkerne resuspendiert und gegebenenfalls 2x mit dem S-Pistill bearbeitet. Ein genügend extrahiertes Pellet ist durch ein zähes Aussehen und schwebende Teilchenreste gekennzeichnet. Der so erhaltene DNA-Halo wird über eine 5minütige Zentrifugation bei 4500 UpM (g) pelletiert. Das deutlich im Volumen vergrößerte, viskose Pellet wird in 20 ml Restriktionspuffer (supplementiert mit 0,1% PMSF-Stammlösung) aufgenommen und 30 Minuten auf einer Wippe bei Raumtemperatur gewaschen. Dieser Waschvorgang wird zweimal mit je 10 ml Restriktionspuffer wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet mit 500 µl Restriktionspuffer versetzt und nach Zugabe von 5-50% Glycerin bei -70 °C gelagert.

5.12.2 Die modifizierte Hochsalzextraktionsmethode

| | |
|-----------------------------|---|
| FSB | 50 mM HEPES; 10 mM NaCl; 5 mM (CH ₃ CO ₂) ₂ Mg (pH 7,5); 25% Glycerin |
| Kernisolierungspuffer (CSK) | 10 mM Pipes (pH 6,8); 100 mM NaCl; 0,3 M Sucrose; 30 mM MgCl ₂ ; 1% TritonX-100 |
| Hochsalzpuffer | 2 M NaCl; 10 mM Pipes (pH 6,8); 10 mM EDTA; 0,1% Digitonin; 0,05 mM Spermine; 0,125 mM Spermidine |
| 10x PBS | 1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 80 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O; 14,7 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,4) |

Anstelle von Detergenzien wie LIS als Extraktionsmittel kann auch eine 2M NaCl-Lösung zur Proteinextraktion und damit zur Kernmatrix-Extraktion verwendet werden. Im Gegensatz zur LIS-Extraktion reflektiert die Salzextraktion auch den transkriptionellen Status der Zelle.

Isolierung von Zellkernen

Die Zellen werden wie bei der LIS-Extraktion geerntet, wenn die Kulturschalen konfluent bewachsen sind. Die Zellen werden trypsinisiert und entweder direkt zur Zellkernisolierung eingesetzt oder in FSB bei -70 °C zwischengelagert. In jedem Fall, entweder nach dem Ernten oder dem Auftauen, werden die Zellen zweimal mit je 5 ml 1x PBS gewaschen. Danach werden die Zellkerne 15 min in kaltem Kernisolierungspuffer inkubiert.

Hochsalzextraktion auf Objektträgern

Für sich anschließende Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) werden die isolierten Zellkerne mit einer Zellzahl von $1,5 \times 10^4$ in einem Volumen von 50 µl auf einen Glasobjektträger zentrifugiert. Dazu werden eine Cytospin der Firma ThermoShandon und Beladevorrichtungen, sogenannte *Cytofunnel*, verwendet. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 800 UpM werden die Objektträger für ungefähr 5 min mit einer 1x PBS Lösung in Glasfärbekästen gewaschen. Anschließend werden die Objektträger 2-5 min (abhängig von der Zelllinie) mit der 2M NaCl-Extraktionslösung behandelt. Dieser Inkubationsschritt führt zur Extraktion löslicher Kernproteine wie Histone und damit zu einer Halo-förmigen Schlaufenstruktur der DNA. Die Objektträger werden für je 2 min in 10x, 5x, 2x und 1x PBS gewaschen und anschließend für je 1 min in 70%, 90% und 100% Ethanol dehydriert. Für eine endgültige Fixierung werden die Präparate 2 h bei 65 °C gebacken, die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

5.12.3 Reassoziationsexperimente

Die unter 5.12.1 beschriebenen LIS-extrahierten Zellkerne werden zunächst pelletiert und mit 1 ml Restriktionspuffer (supplementiert mit 0,1% PMSF-Stammlösung) gewaschen. Anschließend wird die DNA in einem Gesamtvolumen von 500 µl mit 400-600 U Eco RI oder Xba I in Restriktionspuffer verdaut. Ist der Ansatz nach 3-5 Stunden gut pipettierbar, wird das Volumen angepasst und der Verdau auf 7-11 Aliquots a 100 µl aufgeteilt. Die einzelnen Aliquots werden mit je 50 µl *E.coli* Kompetitor-DNA (5.5.5) versetzt. Anschließend werden ca. 200000 counts (in der Regel 50-100 ng DNA pro Ansatz) der zu testenden, mit [³⁵S]dATP radioaktiv markierten, DNA-Fragmente zugesetzt. Bei unterschiedlich großen Fragmenten ist auf Äquimolarität zu achten. Die Ansätze werden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln in einem Thermomixer (Fa. Eppendorf) inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubation werden die Ansätze bei 13000 UpM und 4 °C pelletiert. Die Überstände werden abgenommen und erneut zentrifugiert, um eventuell vorhandene Pelletreste zu entfernen. Die Überstände werden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 50 µl Proteinase K-Lösung (1 ml/ml) versetzt. Die Pelletfraktionen werden zweimal mit 200 µl Restriktionspuffer gewaschen und ebenfalls mit 50 µl Proteinase K-Lösung versetzt. Beide Fraktionen werden bei 56 °C unter Schütteln inkubiert, wobei den Pelletfraktionen noch zweimal Proteinase K-Lösung zugesetzt wird. Abschließend wird die DNA mit Glykogen als Präzipitationshilfe gefällt. Die Fraktionen werden mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl TE gelöst.

5.12.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente

In der Regel werden die getesteten DNA-Fragmente nach dem *modified equal counts approach* aufgetragen (Kay und Bode 1995). Dazu ist ein Kontrollansatz nötig, der ein stark bindendes S/MAR-Fragment und einen nicht-bindenden Vektoranteil enthält. Das stark bindende S/MAR-Element sollte zu 95%-100% in der Pelletfraktion, das Vektorrückgrat dagegen zu 100% im Überstand zu finden sein. Ist das nicht der Fall, kann ein Korrekturfaktor ermittelt werden. In der Regel wird angestrebt, 3000 cpm pro Probe auf ein Agarosegel aufzutragen. Nach Ende der Laufzeit wird das Gel geblottet (5.9.3) und die Membran exponiert.

5.13 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

5.13.1 Herstellung der DNA-Sonden mittels Nick-Translation

Die Methode der Nick-Translation beruht darauf, dass DNase I bei niedriger Enzymkonzentration an statistisch verteilten Stellen eines DNA-Substrates Einzelstrangsnitte, sogenannte *nicks*, erzeugt. DNA-Polymerase I benutzt die entstehenden 3'-OH-Enden als Primer für die DNA-Synthese. Die 5'→3'-Exonuklease Aktivität der DNA Polymerase entfernt dabei gleichzeitig die Nukleotide in Syntheserichtung. Die durch die Exonuklease-Aktivität abgebauten Nukleotide werden durch die Polymerase-Aktivität mit markierten Nukleotiden (Digoxigenin-11-UTP, Biotin-16-UTP, Fluorescein-12-UTP, Tetramethylrhodamin-5-UTP) ersetzt. Ein typischer Reaktionsansatz mit dem *Nick Translation Kit* von Roche sieht wie folgt aus:

| | |
|------------------|--|
| dNTP-Lösung | 1 vol 0,4 mM Dig-11-UTP (oder andere Markierung) 2 vol dTTP (0,4 mM) 3 vol dATP (0,4 mM) 3 vol dCTP (0,4 mM) 3 vol dGTP (0,4 mM) |
| Reaktionsgemisch | 2 µg DNA 10 µl dNTP Lösung 2 µl 10x Puffer auf 18 µl mit aq. bidest auffüllen 2 µl Enzym-Gemisch (DNase I / DNA-Polymerase) |

Die Nick-Translationsreaktion wird für 90-180 min bei 15 °C inkubiert. Da die Hybridisierungseffizienz stark von der Fragmentgröße der markierten Sonde abhängt, wird die

Fragmentgröße vor dem Abstoppen der Reaktion auf einem Agarosegel überprüft. Sonden mit durchschnittlichen Fragmentgrößen oberhalb des optimalen Bereichs von 200-500 Nukleotiden resultieren meist in fleckigen Hintergrundsignalen, die durch unspezifische Anheftung der Probe an die Glasoberfläche entstehen. Außerdem kann die Hybridisierungseffizienz aufgrund der Zugänglichkeit verringert werden. Sonden mit extrem kurzen Fragmenten dagegen beeinträchtigen die Sensitivität aufgrund der schnellen Rehybridisierungskinetik. Bei Erreichen der optimalen Fragmentgröße wird die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8) und Erhitzen auf 65 °C für 10 min gestoppt. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch Chromatographie über eine Sephadex G50 Säule abgetrennt. Die markierten Sonden werden bei -20 °C gelagert.

5.13.2 *In situ* Hybridisierung

| | |
|------------------------------|--|
| Hybridisierungspuffer (1,3x) | 6,5 ml Formamid; 1,3 ml 20x SSC; 0,65 g Dextransulfat; 1 ml Heringsperm-DNA (c = 1 mg/ml); 26 µl 0,5M EDTA; 1,3 ml NaH ₂ PO ₄ -Puffer (0,5 M) (pH 7,4) |
| Denaturierungslösung | 70% deionisiertes Formamid in 2x SSC |
| Waschlösung | 2x SSC |

Die zu hybridisierenden Objektträger werden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und in einer Lösung von Methanol/Eisessig (3:1) für 10 min refixiert. Die Objektträger werden getrocknet und anschließend in 70%iger Formamidlösung bei 72 °C denaturiert. Durch ansteigende Konzentrationen an Ethanol (70%, 90% und 100%) werden die Präparate dehydriert und bei Raumtemperatur getrocknet. 1-2 µl der markierten DNA-Sonde werden mit 12 µl Hybridisierungspuffer (1,3x) und 1 µl Cot-DNA in einem Gesamtvolumen von 15 µl denaturiert. Die Denaturierung erfolgt bei 80 °C für 10 min, die Sonde wird bis zum Gebrauch auf Eis gelagert. Zur Hybridisierung wird die Sonde auf das zu untersuchende Präparat gegeben und mit einem Plastikdeckgläschen bedeckt. Die Ränder werden mit Kleber zum Schutz vor Austrocknung versiegelt. Die Hybridisierung erfolgt in einer feuchten Kammer bei 37 °C über Nacht.

5.13.3 Detektionssysteme für *in situ* Hybridisierungen

5.13.3.1 Direkt markierte Sonden

Nach der Hybridisierung werden die Objektträger in 2x SSC bei RT, 72 °C, 37 °C für jeweils 5 min gewaschen. Eventuell erfolgen noch zwei zusätzliche Waschschrte bei 37 °C mit 2x SSC / 0,2% Tween. Die Präparate werden getrocknet und die DNA mit DAPI gegengefärbt.

5.13.3.2 Indirekte Digoxigenin-11-UTP Markierung

| | |
|--------------------|--|
| Puffer 1 | 100 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl (pH 7,5) |
| Blockierungspuffer | 0,5% Blockierungsreagenz (Roche) in Puffer 1 |
| Waschpuffer | 0,05% Tween > 20 in Puffer 1 |
| Detektionspuffer | 100 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl ₂ (pH 8) |
| Fast Red TR Lösung | 25 mg/ml Fast Red TR in aq. dest. |
| HNPP | 10 mg/ml in DMF |

Die Waschschrte nach der Hybridisierung erfolgen analog den oben beschriebenen. Zur Signal-Detektion werden die Präparate nach den Waschschrten mit einer Anti-Digoxigenin-AP

Antikörperlösung (1:500 in Blockierungspuffer verdünnt) inkubiert. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C in einer feuchten Kammer für eine Stunde. Die Objektträger werden dreimal für 10 min in Waschpuffer und zweimal für 10 min in Detektionspuffer gewaschen. Das HNPP / Fast Red Detektionsgemisch wird im Verhältnis 1:1 in Detektionspuffer (10 µl HNPP, 10 µl Fast Red, 1 ml Puffer) angesetzt und mit einem 0,2 µm Nylonfilter filtriert, um unspezifisches Präzipitat zu entfernen. Bis zum Gebrauch wird der HNPP-Mix dunkel auf Eis gelagert.

20-50 µl des filtrierten Detektionsgemisches werden auf den Objektträger gegeben und mit einem Plastikdeckgläschen abgedeckt. Nach 30minütiger Inkubation bei RT wird für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und die Signalintensität gegebenenfalls nochmals mit HNPP / Fast Red verstärkt. Der Detektionsschritt kann je nach Kopienzahl bis zu dreimal wiederholt werden, was sich vor allem bei Einzelkopiesequenzen anbietet. Nach dem letzten Detektionsschritt wird das Präparat für 10 min mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Die hybridisierte DNA wird mit DAPI gegengefärbt.

5.13.4 Mikroskopische Auswertung der *in situ* Hybridisierungen

Die Bildauswertung von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen erfolgt unter einem Durchlichtmikroskop (Zeiss) über eine digitale CCD-Kamera. Die Auflösung der Kamera beträgt 1317 x 1035 Pixel. Standardmäßig wird bei Verwendung der CCD-Kamera ein 63er Ölimersionsobjektiv benutzt. Ein Filtersatz von OmegaOptical ermöglicht die Trennung von roter, grüner und blauer Fluoreszenz (Rot: Anregung = 540nm, Emission = 585 nm; Grün: Anregung = 475 nm, Emission = 535 nm; Blau: Anregung = 387 nm, Emission = 535 nm). Die erhaltenen Bilder werden mit Hilfe der Software *IPLab Spectrum* (SignalAnalytics) bearbeitet. Diese ermöglicht die nachträgliche Kolorierung der schwarz/weiß Bilder, eine Überlagerung derselben und die Prozessierung auf 8 bit TIFF-Bilder.

6. Abkürzungen & Zeichen

| | |
|-------------|---|
| A | Adenosin |
| α | alpha |
| Abb. | Abbildung |
| amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| β | beta |
| Bac | <i>bacterial artificial chromosome</i> |
| β geo | Fusionsgen aus LacZ und neo ^R |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| BUR | <i>base-unpairing region</i> |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| °C | Grad Celsius |
| cds | <i>coding sequence</i> |
| cm | Zentimeter |
| cos | Cosmid |
| CT | Chromosomen-Territorium |
| CUE | <i>core unwinding element</i> |
| cDNA | kodierende Desoxyribonukleinsäure |
| DAPI | 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol |
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphat (N steht für Adenosin, Cytidin, Guanosin und Thymidin) |
| ddNTP | Didesoxyribonukleotidphosphat |
| DHGP | Deutsches Humanes Genomprojekt |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DME | <i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase I | Desoxyribonuklease I hypersensitive Site |
| DNase I HS | Desoxyribonuklease I |
| ds | doppelsträngig |
| DTT | Dithiothreitol |
| enh | Enhancer |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunoassay</i> |
| EMSA | <i>electrophoretic mobility shift assay</i> |
| ES | Embryonale Stammzellen der Maus |
| et al. | <i>et altera</i> , und andere |
| F | Fragment |

| | |
|------------------|---|
| Fa. | Firma |
| FCS | foetales Kälberserum |
| FISH | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung |
| fmol | Femtomol |
| FRT | <i>FLP-Recombinase Recognition Target Sites</i> |
| g | Gramm |
| G | Guanin |
| γ | gamma |
| G418 | Aminoglycosid-2'-Deoxystreptin (Gentamycin-Derivat) |
| Gal | β -Galaktosidase |
| GANC | Ganciclovir |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> |
| h | Stunde |
| Hepes | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure |
| HMW-DNA | <i>high molecular weight</i> DNA |
| HNPP | 2-Hydroxy-3-Naphtoicacid-2'-Phenylanilid Phosphat |
| ICD | Interchromatin-Domäne |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| K | Klon |
| kan | Kanamycin |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| l | Liter |
| λ | lambda |
| LacZ | β -Galactosidase |
| LBR | <i>loop basement attachment region</i> |
| LCR | <i>locus control region</i> |
| LTR | <i>long terminal repeat</i> |
| LU | Luciferase |
| M | molar |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mol | Mol |
| mM | millimolar |
| MPSV | Myeloproliferativer Sarkomavirus |
| mRNA | messenger-RNA |
| MUG | 4-Methylumbelliferryl- β -D-Galaktosid |
| neo ^R | Neomycinphosphotransferase |
| ng | Nanogramm |
| NS | Nukleinsäuren |
| nm | Nanometer |
| Ω | Ohm |
| ω | omega |
| ori | <i>origin of replication</i> |

| | |
|-------|---|
| P | Pellet |
| P | Promotor |
| p | Plasmid |
| Ψ | Psi |
| PBS | <i>phosphate-buffered saline</i> |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PEG | Polyethylenglycol |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| pmol | Picomol |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| S | <i>supernatant</i> , Überstand |
| S/MAR | <i>scaffold/matrix attachment region</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| SIDD | <i>stress-induced duplex destabilization</i> |
| s.o. | siehe oben |
| SV40 | Simian Virus 40 |
| T | Terminator |
| T | Thymin |
| Tab | Tabelle |
| TAE | Tris-Azetat-EDTA-Puffer |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin |
| Tk | Thymin-Kinase |
| Tris | Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan |
| U | <i>units</i> , Einheit zur Kennzeichnung von Enzymaktivitäten |
| u.a. | unter anderem |
| UE | <i>unpairing elements</i> |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| UTR | <i>untranslated region</i> |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| vgl. | vergleiche |
| Vol | Volumen |
| VSV | Vesicular Stomatitis Virus |
| v/v | Volumen/Volumen (Volumenprozent) |
| w/v | Gewicht/Volumen (Gewichtsprozent) |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl -β-D-Galaktosid |
| z.B. | zum Beispiel |

7. Literatur

ALVAREZ J. D., YASUI D. H., NIIDA H., JOH T., LOH D. Y., KOHWI-SHIGEMATSU T. (2000) The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development; *Genes Dev* 14(5): 521-35

AMATI B., PICK L., LAROCHE T., GASSER S. M. (1990) Nuclear scaffold attachment stimulates, but is not essential for ARS activity in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the *Drosophila* ftz SAR; *EMBO J* 9(12): 4007-16

ANDERSON J. N. (1986) Detection, sequence patterns and function of unusual DNA structures; *Nucleic Acids Res* 14(21): 8513-33

ANTES T. J., NAMCIU S. J., FOURNIER R. E., LEVY-WILSON B. (2001) The 5' boundary of the human apolipoprotein B chromatin domain in intestinal cells; *Biochemistry* 40(23): 6731-42

BAER A., SCHUBELER D., BODE J. (2000) Transcriptional properties of genomic transgene integration sites marked by electroporation or retroviral infection; *Biochemistry* 39(24): 7041-9

BAER A., BODE J. (2001) Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes; *Curr Opin Biotechnol* 12(5): 473-80

BAIKER A., MAERCKER C., PIECHACZEK C., SCHMIDT S. B., BODE J., BENHAM C., LIPPS H. J. (2000) Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix; *Nat Cell Biol* 2(3): 182-4

BARKER D. D., WU H., HARTUNG S., BREINDL M., JAENISCH R (1991) Retrovirus-induced insertional mutagenesis: mechanism of collagen mutation in Mov13 mice; *Mol Cell Biol* 11(10): 5154-63

BELL A. D., WEST A. G., FELSENFELD G. (2001) Insulators and Boundaries: Versatile regulatory elements in the eucaryotic genome; *Science* 291: 447-50

BENHAM C., KOHWI SHIGEMATSU T., BODE J. (1997) Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions; *J Mol Biol* 274(2): 181-96

BENHAM C. J. (1992) Energetics of the strand separation transition in superhelical DNA; *J Mol Biol* 225(3): 835-47

BENHAM C. J. (1996) Computation of DNA structural variability--a new predictor of DNA regulatory regions; *Comput Appl Biosci* 12(5): 375-81

- BEREZNEY R., COFFEY D. S. (1974) Identification of a nuclear protein matrix; *Biochem Biophys Res Commun* 60(4): 1410-7
- BESTOR T. H. (1998) Gene silencing. Methylation meets acetylation; *Nature* 393(6683): 311-2
- BINGHAM P. M. (1997) Cosuppression comes to the animals; *Cell* 90(3): 385-7
- BODE J., MAASS K. (1988) Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions; *Biochemistry* 27(13): 4706-11
- BODE J., PUCHER H. J., MAASS K. (1986) Chromatin structure and induction-dependent conformational changes of human interferon-beta genes in a mouse host cell; *Eur J Biochem* 158(2): 393-401
- BODE J., KOHWI Y., DICKINSON L., JOH T., KLEHR D., MIELKE C., KOHWI-SHIGEMATSU T. (1992) Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs; *Science* 255(5041): 195-7
- BODE J., STENGERT-IBER M., KAY V., SCHLAKE T., DIETZ-PFEILSTETTER A. (1996) Scaffold/Matrix-Attached Regions: Topological Switches with Multiple Regulatory Functions; *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 6(2-3): 115-38
- BODE J., BENHAM C., KNOPP A., MIELKE C. (2000a) Transcriptional Augmentation: Modulation of Gene Expression by Scaffold/Matrix-Attached Regions; *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10(1): 73-90
- BODE J., BENHAM C., ERNST E., KNOPP A., MARSCHALEK R., STRICK R., STRISSEL P. (2000b) Fatal connections: when DNA ends meet on the nuclear matrix; *J Cell Biochem Suppl* 35: 3-22
- BONIFER C., YANNOOTSOS N., KRUGER G., GROSVELD F., SIPPEL A. E. (1994) Dissection of the locus control function located on the chicken lysozyme gene domain in transgenic mice; *Nucleic Acids Res* 22(20): 4202-10
- BOULIKAS T. (1993) Nature of DNA sequences at the attachment regions of genes to the nuclear matrix; *J Cell Biochem* 52(1): 14-22
- BOULIKAS T. (1995) Chromatin domains and prediction of MAR sequences; *Int Rev Cytol* 162A: 279-388
- CAI S., KOHWI-SHIGEMATSU T. (1999) Intranuclear relocalization of matrix binding sites during T cell activation detected by amplified fluorescence in situ hybridization; *Methods* 19(3): 394-402

CAVAZZANA-CALVO M., HACEIN-BEY S., DE SAINT BASILE G., GROSS F., YVON E., NUSBAUM P., SELZ F., HUE C., CERTAIN S., CASANOVA J. L., BOUSSO P., DEIST F. L., FISCHER A. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease; *Science* 288(5466): 669-72

CHUNG J. H., WHITELEY M., FELSENFELD G. (1993) A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*; *Cell* 74(3): 505-14

CLARKE H. J. (1992) Nuclear and chromatin composition of mammalian gametes and early embryos; *Biochem Cell Biol* 70(10-11): 856-66

COCKERILL P. N., GARRARD W. T. (1986) Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites; *Cell* 44: 273-82

COCKERILL P. N., YUEN M. H., GARRARD W. T. (1987) The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements; *J Biol Chem* 262(11): 5394-97

COHEN M., LEE K. K., WILSON K. L., GRUENBAUM Y. (2001) Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina; *Trends Biochem Sci* 26(1): 41-7

COOK P. R. (1999) The organization of replication and transcription; *Science* 284(5421): 1790-5

CREMER T., CREMER C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells; *Nat Rev Genet* 2(4): 292-301

CREMER T., KRETH G., KOESTER H., FINK R. H., HEINTZMANN R., CREMER M., SOLOVEI I., ZINK D., CREMER C. (2000) Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture; *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10(2): 179-212

CROFT J. A., BRIDGER J. M., BOYLE S., PERRY P., TEAGUE P., BICKMORE W. A. (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus; *J Cell Biol* 145(6): 1119-31

DANG Q., AUTEN J., PLAVEC I. (2000) Human Beta Interferon Scaffold Attachment Region inhibits de novo methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector; *J Virol* 74(6): 2671-8

DAVIE J. R. (1998) Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates; *Curr Opin Genet Dev* 8(2): 173-8

- DE BELLE I., CAI S., KOHWI-SHIGEMATSU T. (1998) The genomic sequences bound to special AT-rich sequence-binding protein 1 (SATB1) in vivo in Jurkat T cells are tightly associated with the nuclear matrix at the bases of the chromatin loops; *J Cell Biol* 141(2): 335-48
- DIAZ M. O., RUBIN C. M., HARDEN A., ZIEMIN S., LARSON R. A., LE BEAU M. M., ROWLEY J. D. (1990) Deletions of interferon genes in acute lymphoblastic leukemia; *N Engl J Med* 322(2): 77-82
- DIAZ M. O., POMYKALA H. M., BOHLANDER S. K., MALTEPE E., MALIK K., BROWNSTEIN B., OLOPADE O. I. (1994) Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig; *Genomics* 22(3): 540-52
- DIAZ M. O. (1995) The human type I interferon gene cluster; *Seminars in Virology* 6: 143-9
- DICKINSON L. A., JOH T., KOHWI Y., KOHWI-SHIGEMATSU T. (1992) A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition; *Cell* 70(4): 631-45
- DICKINSON L. A., DICKINSON C. D., KOHWI-SHIGEMATSU T. (1997) An atypical homeodomain in SATB1 promotes specific recognition of the key structural element in a matrix attachment region; *J Biol Chem* 272(17): 11463-70
- DIETZ A., KAY V., SCHLAKE T., LANDSMANN J., BODE J. (1994) A plant scaffold attached region detected close to a T-DNA integration site is active in mammalian cells; *Nucleic Acids Res* 22: 2744-51
- DIETZEL S., SCHIEBEL K., LITTLE G., EDELMANN P., RAPPOLD G. A., EILS R., CREMER C., CREMER T. (1999) The 3D positioning of ANT2 and ANT3 genes within female X chromosome territories correlates with gene activity; *Exp Cell Res* 252(2): 363-75
- DILLON N., GROSVELD F. (1994) Chromatin domains as potential units of eukaryotic gene function; *Curr Opin Genet Dev* 4(2): 260-4
- FACKELMAYER F. O., DAHM K., RENZ A., RAMSPERGER U., RICHTER A. (1994) Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro; *Eur J Biochem* 221(2): 749-57
- FERNANDEZ L. A., WINKLER M., GROSSCHEDL R. (2001) Matrix attachment region-dependent function of the immunoglobulin mu enhancer involves histone acetylation at a distance without changes in enhancer occupancy; *Mol Cell Biol* 21(1): 196-208
- FESTENSTEIN R., TOLAINI M., CORBELLA P., MAMALAKI C., PARRINGTON J., FOX M., MILIOU A., JONES M., KIOUSSIS D. (1996) Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation; *Science* 271(5252): 1123-5
- FINCH J. T., KLUG A. (1978) X-ray and electron microscope analyses of crystals of nucleosome cores; *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42(1): 1-9

FORRESTER W. C., THOMPSON C., ELDER J. T., GROUDINE M. (1986) A developmentally stable chromatin structure in the human beta-globin gene cluster; *Proc Natl Acad Sci USA* 83(5): 1359-63

FORRESTER W. C., TAKEGAWA S., PAPAYANNOPOULOU T., STAMATOYANNOPOULOS G., GROUDINE M. (1987) Evidence for a locus activation region: the formation of developmentally stable hypersensitive sites in globin-expressing hybrids; *Nucleic Acids Res* 15(24): 10159-77

FORRESTER W. C., EPNER E., DRISCOLL M. C., ENVER T., BRICE M., PAPAYANNOPOULOU T., GROUDINE M. (1990) A deletion of the human beta-globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire beta-globin locus; *Genes Dev* 4(10): 1637-49

FORRESTER W. C., FERNANDEZ L. A., GROSSCHEDL R. (1999) Nuclear matrix attachment regions antagonize methylation-dependent repression of long-range enhancer-promoter interactions; *Genes Dev* 13(22): 3003-14

FOSTER K. A., COLLINS J. M. (1985) The interrelation between DNA synthesis rates and DNA polymerases bound to the nuclear matrix in synchronized HeLa cells; *J Biol Chem* 260(7): 4229-35

FRASER P., PRUZINA S., ANTONIOU M., GROSVELD F. (1993) Each hypersensitive site of the human beta-globin locus control region confers a different developmental pattern of expression on the globin genes; *Genes Dev* 7(1): 106-13

FROMMER M., MCDONALD L. E., MILLAR D. S., COLLIS C. M., WATT F., GRIGG G. W., MOLLOY P. L., PAUL C. L. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands; *Proc Natl Acad Sci USA* 89(5): 1827-31

GALL J. G., PARDUE M. L. (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations; *Proc Natl Acad Sci USA* 63(2): 378-83

GARRICK D., FIERING S., MARTIN D. I. K., WHITELAW E. (1998) Repeat-induced gene silencing in mammals; *Nat Genet* 18(1): 56-9

GASSER S. M., LAEMMLI U. K. (1986) Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*; *Cell* 46: 521-30

GASSER S. M., LAROCHE T., FALQUET J., BOY DE LA TOUR E., LAEMMLI U. K. (1986) Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II; *J Mol Biol* 188(4): 613-29

GIDEKEL S., BERGMAN Y. (2002) A unique developmental pattern of Oct-3/4 DNA methylation is controlled by a cis-demodification element; *J Biol Chem* 277(37): 34521-30

GLUCH A. (2002) Identifizierung und Analyse bioinformatisch vorhergesagter und neuer S/MAR-Elemente; *Arbeitsbericht Genomatix Software München*

GÖHRING F., FACKELMAYER F. O. (1997) The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study; *Biochemistry* 36(27): 8276-83

GOETZE S., GLUCH A., BENHAM C., BODE J. (2003) Computational and in vitro analysis of destabilized DNA regions in the interferon gene cluster: potential of predicting functional gene domains; *Biochemistry* 42(1): 154-66

GOLDMAN R. D., GRUENBAUM Y., MOIR R. D., SHUMAKER D. K., SPANN T. P. (2002) Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture; *Genes Dev* 16(5): 533-47

GREGER I. H., PROUDFOOT N. J. (1998) Poly(A) signals control both transcriptional termination and initiation between the tandem GAL10 and GAL7 genes of *Saccharomyces cerevisiae*; *EMBO J* 17(16): 4771-9

GROSS G., MAYR U., BRUNS W., GROSVELD F., DAHL H.M., COLLINS J. (1981) The structure of a thirty-six kilobase region of the human chromosome including the fibroblast interferon gene IFN- β ; *Nucleic Acids Research*(9): 2495-507

GROSVELD F., VAN ASSENDELFT G. B., GREAVES D. R., KOLLIAS G. (1987) Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice; *Cell* 51(6): 975-85

GRUNSTEIN M. (1990) Nucleosomes: regulators of transcription; *Trends Genet* 6(12): 395-400

HANCOCK R. (2000) A new look at the nuclear matrix; *Chromosoma* (109): 219-25

HART C. M., LAEMMLI U. K. (1998) Facilitation of chromatin dynamics by SARs; *Curr Opin Genet Dev* 8(5): 519-25

HAUSER H., GROSS G., BRUNS W., HOCHKEPPEL H., MAYR U., COLLINS J. (1982) Inducibility of human β -Interferon gene in mouse L-cell clones; *Nature* 297: 650-4

HENCO K., BROSIUS J., FUJISAWA A., FUJISAWA J. I., HAYNES J. R., HOCHSTADT J., KOVACIC T., PASEK M., SCHAMBOCK A., SCHMID J., ET A. L. (1985) Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes; *J Mol Biol* 185(2): 227-60

HENDZEL M. J., SUN J. M., CHEN H. Y., RATTNER J. B., DAVIE J. R. (1994) Histone acetyltransferase is associated with the nuclear matrix; *J Biol Chem* 269(36): 22894-901

HENG H. H., TSUI L. C. (1998) High resolution free chromatin/DNA fiber fluorescent in situ hybridization; *J Chromatogr A* 806(1): 219-29

HENG H. H., GOETZE S., YE C. J., LU W., LIU G., BREMER S., HUGHES M., BODE J., KRAWETZ S.A., Chromatin Loops are selectively anchored using Scaffold/Matrix attachment regions; *zur Veröffentlichung eingereicht*

HÖRTNAGEL K., MAUTNER J., STROBL L. J., WOLF D. A., CHRISTOPH B., GELTINGER C., POLACK A. (1995) The role of immunoglobulin kappa elements in c-myc activation; *Oncogene* 10(7): 1393-401

HOZAK P., JACKSON D. A., COOK P. R. (1994) Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle; *J Cell Sci* 107 (8): 2191-202

HUESEMANN Y. (2002) Halo-FISH: Ausbau einer neuen Methode zum *in situ* Nachweis von Chromatin-Domänen; *Diplomarbeit*

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome; *Nature* 409(15): 860-921

ISAACS A., LINDENMANN J. (1987) Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957; *J Interferon Res* 7(5): 429-38

JARMAN A. P., HIGGS D. R. (1988) Nuclear scaffold attachment sites in the human globin gene complexes; *EMBO J* 7(11): 3337-44

JENUWEIN T., GROSSCHEDL R. (1991) Complex pattern of immunoglobulin mu gene expression in normal and transgenic mice: nonoverlapping regulatory sequences govern distinct tissue specificities; *Genes Dev* 5(6): 932-43

KÄS E., LAEMMLI U. K. (1992) In vivo topoisomerase II cleavage of the *Drosophila* histone and satellite III repeats: DNA sequence and structural characteristics; *EMBO J* 11(2): 705-16

KALOS M., FOURNIER R. E. K. (1995) Position-independent transgene expression mediated by boundary elements from the Apolipoprotein B chromatin domain; *Mol Cell Biol* 15 (1): 198-207

KAY V., BODE J. (1995) Detection of scaffold-attached regions (SARs) by in vitro techniques: activities of these elements in vivo methods in molecular and cellular biology; *Methods in Molecular and Cellular Biology: Methods for studying DNA-Protein Interactions, an overview* 5: 186-94

KIPP M., GOHRING F., OSTENDORP T., VAN DRUNEN C. M., VAN DRIEL R., PRZYBYLSKI M., FACKELMAYER F. O. (2000) SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA; *Mol Cell Biol* 20(20): 7480-9

KIT et al. (1963) *Exp Cell Res* 31: 297-312.

KIYAMA R., TRIFONOV E. N. (2002) What positions nucleosomes?--A model; *FEBS Lett* 523(1-3): 7-11

KLEHR D., MAASS K., BODE J. (1991) Scaffold-attached regions from the human interferon Beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters; *Biochemistry* 30: 1264-70

KOHWI-SHIGEMATSU T., MAASS K., BODE J. (1997) A thymocyte factor SATB1 suppresses transcription of stably integrated matrix-attachment region-linked reporter genes; *Biochemistry* 36(40): 12005-10

LEVY-WILSON B., FORTIER C. (1989) The limits of the DNase I-sensitive domain of the human apolipoprotein B gene coincide with the locations of chromosomal anchorage loops and define the 5' and 3' boundaries of the gene; *J Biol Chem* 264(35): 21196-204

LEWIS C. D., LEBKOWSKI J. S., DALY A. K., LAEMMLI U. K. (1984) Interphase nuclear matrix and metaphase scaffolding structures; *J Cell Sci Suppl* 1: 103-22

LI Q., ZHANG M., DUAN Z., STAMATOYANNOPOULOS G. (1999) Structural analysis and mapping of DNase I hypersensitivity of HS5 of the beta-globin locus control region; *Genomics* 61(2): 183-93

LICHTER P., CREMER T., BORDEN J., MANUELIDIS L., WARD D. C. (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries; *Hum Genet* 80(3): 224-34

LIEBICH I., BODE J., FRISCH M., WINGENDER E. (2002) S/MARt DB: a database on scaffold/matrix attached regions; *Nucleic Acids Res* 30(1): 372-4

LIPPS H. J., BODE J. (2001) Exploiting chromosomal and viral strategies: the design of safe and efficient non-viral gene transfer systems; *Curr Opin Mol Ther* 3(2): 133-41

LIU L. F., WANG J. C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription; *Proc Natl Acad Sci USA* 84(20): 7024-7

LUDERUS M. E., DE GRAAF A., MATTIA E., DEN BLAAUWEN J. L., GRANDE M. A., DE JONG L., VAN DRIEL R. (1992) Binding of matrix attachment regions to lamin B1; *Cell* 70(6): 949-59

LUDERUS M. E., DEN BLAAUWEN J. L., DE SMIT O. J., COMPTON D. A., VAN DRIEL R. (1994) Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove; *Mol Cell Biol* 14(9): 6297-305

MANIATIS T., FRITSCH E. F., SAMBROOK J. (1982) Molecular cloning. A laboratory manual; *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*

MARIE I., DURBIN J. E., LEVY D. E. (1998) Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7; *EMBO J* 17(22): 6660-9

MARSHALL E. (2002) Clinical research. Gene therapy a suspect in leukemia-like disease; *Science* 298(5591): 34-5

MARTENS J. H., VERLAAN M., KALKHOVEN E., DORSMAN J. C., ZANTEMA A. (2002) Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes; *Mol Cell Biol* 22(8): 2598-606

METTE M. F., VAN DER WINDEN J., MATZKE M. A., MATZKE A. J. (1999) Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans; *EMBO J* 18(1): 241-8

MIELKE C., KOHWI Y., KOHWI-SHIGEMATSU T., BODE J. (1990) Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: correlation of properties in vitro and function in vivo; *Biochemistry* 29(32): 7475-85

MIELKE C., MAASS K., TÜMMLER M., BODE J. (1996) Anatomy of highly expressing chromosomal sites targeted by retroviral vectors; *Biochemistry* 35(7): 2239-52

MIELKE C., CHRISTENSEN M. O., WESTERGAARD O., BODE J., BENHAM C. J., BREINDL M. (2002) Multiple collagen 1 gene regulatory elements have sites of stress-induced DNA duplex destabilization and nuclear scaffold/matrix association potential; *J Cell Biochem* 84(3): 484-96

MIRKOVITCH J., MIRAULT M. E., LAEMMLI U. K. (1984) Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold; *Cell* 39: 223-32

MIRKOVITCH J., GASSER S. M., LAEMMLI U. K. (1988) Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes; *J Mol Biol* 200: 101-10

MISTELI T. (2001) Nuclear structure - Protein dynamics: Implications for nuclear architecture and gene expression; *Science* 291(5505): 843-7

MOIR R. D., SPANN T. P., HERRMANN H., GOLDMAN R. D. (2000) Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication; *J Cell Biol* 149(6): 1179-92

MOIR R. D., YOON M., KHUON S., GOLDMAN R. D. (2000) Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells; *J Cell Biol* 151(6): 1155-68

NABIROCHKIN S., OSSOKINA M., HEIDMANN T. (1998) A nuclear matrix/scaffold attachment region co-localizes with the gypsy retrotransposon insulator sequence; *J Biol Chem* 273(4): 2473-9

- NAKAGOMI K., KOHWI Y., DICKINSON L. A., KOHWI-SHIGEMATSU T. (1994) A novel DNA-binding motif in the nuclear matrix attachment DNA-binding protein SATB1; *Mol Cell Biol* 14(3): 1852-60
- NAKAMURA M., SUGITA K., INUKAI T., GOI K., IJIMA K., TEZUKA T., KOJIKI S., SHIRAISHI K., MIYAMOTO N., KARAKIDA N., KAGAMI K., O-KOYAMA T., MORI T., NAKAZAWA S. (1999) p16/MTS1/INK4A gene is frequently inactivated by hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 translocation; *Leukemia* 13(6): 884-90
- NAMCIU S. J., BLOCHLINGER K. B., FOURNIER R. E. (1998) Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*; *Mol Cell Biol* 18(4): 2382-91
- NAN X., NG H. H., JOHNSON C. A., LAHERTY C. D., TURNER B. M., EISENMAN R. N., BIRD A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex; *Nature* 393(6683): 386-9
- NAYLER O., STRATLING W., BOURQUIN J. P., STAGLJAR I., LINDEMANN L., JASPER H., HARTMANN A. M., FACKELMAYER F. O., ULLRICH A., STAMM S. (1998) SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements; *Nucleic Acids Res* 26(15): 3542-9
- NICKERSON J. (2001) Experimental observations of a nuclear matrix; *J Cell Sci* 114(Pt 3): 463-74
- OVITT C. E., SCHÖLER H. R. (1998) The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo; *Mol Hum Reprod* 4(11): 1021-31
- PAUL A. L., FERL R. J. (1998) Higher order chromatin structures in maize and Arabidopsis; *Plant Cell* 10(8): 1349-59
- PAULSON J. R., LAEMMLI U. K. (1977) The structure of histone-depleted metaphase chromosomes; *Cell* 12(3): 817-28
- PHI-VAN L., STRATLING W. H. (1996) Dissection of the ability of the chicken lysozyme gene 5' matrix attachment region to stimulate transgene expression and to dampen position effects; *Biochemistry* 35(33): 10735-42
- PHI-VAN L., VON KRIES J. P., OSTERTAG W., STRÄTLING W. H. (1990) The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes; *Mol Cell Biol* 10(5): 2302-7
- PIKAART M. J., RECILLAS TARGA F., FELSENFELD G. (1998) Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators; *Genes Dev* 12(18): 2852-2862

RÄTSCH A., JOOS S., KIOSCHIS P., LICHTER P. (2002) Topological organization of the MYC/IGK locus in Burkitt's lymphoma cells assessed by nuclear halo preparations; *Exp Cell Res* 273(1): 12-20

RECILLAS-TARGA F., PIKAART M. J., BURGESS-BEUSSE B., BELL A. C., LITT M. D., WEST A. G., GASZNER M., FELSENFELD G. (2002) Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities; *Proc Natl Acad Sci USA* 99(10): 6883-8

RENZ A., FACKELMAYER F. O. (1996) Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA; *Nucleic Acids Res* 24(5): 843-9

RICHMOND T. J., FINCH J. T., RUSHTON B., RHODES D., KLUG A. (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution; *Nature* 311(5986): 532-7

ROBERTS R. M., LIU L. M., GUO Q. T., LEAMAN D., BIXBY J. (1998) The evolution of the type I interferons- Review; *J Interferon Cytokine Res* 18(10): 805-16

ROHDE K., KOERNICKE I., DAMASCHUN G., SCHELER W. (1978) Effect of protein-protein interactions on binding of ligands by proteins; *Acta Biol Med Ger* 37(11-12): 1645-54

ROMIG H., FACKELMAYER F. O., RENZ A., RAMSPERGER U., RICHTER A. (1992) Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements; *EMBO J* 11(9): 3431-40

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-7

SCANGOS G., RUDDLE F. H. (1981) Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review; *Gene* 14(1-2): 1-10

SCHERDIN U., RHODES K., BREINDL M. (1990) Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration; *J Virol* 64(2): 907-12

SCHERF M., KLINGENHOFF A., WERNER T. (2000) Highly Specific Localization of Promoter Regions in Large Genomic Sequences by PromoterInspector: A Novel Context Analysis Approach; *J Mol Biol* 297 (3): 599-606

SCHIMKE R. T. (1984) Gene Amplification in Cultured Animal Cells; *Cell* 37: 705-13

SCHROTH G. P., HO P. S. (1995) Occurrence of potential cruciform and H-DNA forming sequences in genomic DNA; *Nucleic Acids Res* 23(11): 1977-83

SCHUEBELER D., MIELKE C., MAASS K., BODE J. (1996) Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context-dependent manner; *Biochemistry* 35(34): 11160-9

- SHEFLIN L. G., KOWALSKI D. (1985) Altered DNA conformations detected by mung bean nuclease occur in promoter and terminator regions of supercoiled pBR322 DNA; *Nucleic Acids Res* 13(17): 6137-54
- SHIH C. C., STOYE J. P., COFFIN J. M. (1988) Highly preferred targets for retrovirus integration; *Cell* 53(4): 531-7
- SIEGAL F. P., KADOWAKI N., SHODELL M., FITZGERALD BOCARSLY P. A., SHAH K., HO S., ANTONENKO S., LIU Y. J. (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood; *Science* 284(5421): 1835-7
- SINGH G. B., KRAMER J. A., KRAWETZ S. A. (1997) Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix; *Nucleic Acids Res* 25(7): 1419-1425
- SPECTOR D. L. (2001) Nuclear domains; *J Cell Sci* 114(16): 2891-3
- STEIN G. S., VAN WIJNEN A. J., STEIN J. L., LIAN J. B., MCNEIL S., POCKWINSE S. M. (1999) Transcriptional control within the three-dimensional context of nuclear architecture: requirements for boundaries and direction; *J Cell Biochem Suppl* 32-33: 24-31
- STIEF A., WINTER D. M., STRATLING W. H., SIPPEL A. E. (1989) A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity; *Nature* 341(6240): 343-5
- STRISSEL P. L., DANN H. A., POMYKALA H. M., DIAZ M. O., ROWLEY J. D., OLOPADE O. I. (1998) Scaffold-associated regions in the human type I interferon gene cluster on the short arm of chromosome 9; *Genomics* 47(2): 217-29
- STUURMAN N., HEINS S., AEBI U. (1998) Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions; *J Struct Biol* 122(1-2): 42-66
- TSUTSUI K. (1998) Synthetic concatemers as artificial MAR: importance of a particular configuration of short AT-tracts for protein recognition; *Gene Ther Mol Biol* 1: 581-90
- VASSETZKY Y., HAIR A., MECHALI M. (2000) Rearrangement of chromatin domains during development in *Xenopus*; *Genes Dev* 14(12): 1541-52
- VON KRIES J. P., PHI-VAN L., DIEKMANN S., STRATLING W. H. (1990) A non-curved chicken lysozyme 5' matrix attachment site is 3' followed by a strongly curved DNA sequence; *Nucleic Acids Res* 18(13): 3881-5.
- VON KRIES J. P., BUHRMESTER H., STRATLING W. H. (1991) A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding; *Cell* 64(1): 123-35
- WADE P. A., PRUSS D., WOLFFE A. P. (1997) Histone acetylation: chromatin in action; *Trends Biochem Sci* 22(4): 128-32

WEITZEL J. M., BUHRMESTER H., STRATLING W. H. (1997) Chicken MAR-binding protein ARBP is homologous to rat methyl-CpG-binding protein MeCP2; *Mol Cell Biol* 17(9): 5656-66

WIEGANT J., KALLE W., MULLENDERS L., BROOKES S., HOOVERS J. M., DAUWERSE J. G., VAN OMMEN G. J., RAAP A. K. (1992) High-resolution in situ hybridization using DNA halo preparations; *Hum Mol Genet* 1(8): 587-91

WOLFFE A. P., MATZKE M. A. (1999) Epigenetics: regulation through repression; *Science* 286(5439): 481-6

WOLFFE A. P., PRUSS D. (1996) Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones; *Cell* 84(6): 817-9

YASUI D., MIYANO M., CAI S., VARGA-WEISZ P., KOHWI-SHIGEMATSU T. (2002) SATB1 targets chromatin remodelling to regulate genes over long distances; *Nature* 419(6907): 641-5

ZARET K. S., SHERMAN F. (1982) DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast; *Cell* 28(3): 563-73

ZENG C., HE D., BRINKLEY B. R. (1994) Localization of NuMA protein isoforms in the nuclear matrix of mammalian cells; *Cell Motil Cytoskeleton* 29(2): 167-76

ZHAO K., HAREL A., STUURMAN N., GUEDALIA D., GRUENBAUM Y. (1996) Binding of matrix attachment regions to nuclear lamin is mediated by the rod domain and depends on the lamin polymerization state; *FEBS Lett* 380(1-2): 161-4

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Epigenetische Regulation an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Braunschweig unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Bode angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode für die Ermöglichung und Betreuung meiner Dissertation. Seine Diskussionsbereitschaft hat viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vor allem möchte ich mich für seine Unterstützung bezüglich meines Forschungsaufenthaltes in den USA bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und für die Übernahme des Koreferats, sowie Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn für seine Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Prof. Dr. Stephen Krawetz möchte ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor während meines Forschungsaufenthaltes in Detroit danken. Mein Dank gilt auch Susan Wykes und Chuck Ostermeier, die mich dort in allem unterstützt und mir beim Zurechtfinden geholfen haben.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) sowie beim Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) möchte ich mich für die finanzielle Förderung meiner Arbeit bzw. meines USA-Aufenthaltes bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „EUGEN“ an der GBF, mein besonderer Dank gilt dabei dem „SAR-Labor“. Die Zusammenarbeit mit Alexandra Baer, Ellen Ernst, Angela Gluch, Yves Huesemann, Martin Klar, Karin Maaß und Kristina Nehlsen hat mir viel Spaß gemacht. Für praktische Tips und „sprachliche Ratschläge“ war immer gesorgt.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Eltern, die mich moralisch und finanziell während meiner Ausbildung unterstützt haben.

